

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-501453

第3部門第2区分

(43)公表日 平成6年(1994)2月17日

(51) Int.Cl. <sup>*</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
A 61 K 37/50	AD Y	8314-4C	
7/28		7252-4C	
9/08	F	7329-4C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平3-511587  
(86) (22)出願日 平成3年(1991)7月18日  
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)1月19日  
(86)国際出願番号 PCT/BE91/00048  
(87)国際公開番号 WO92/01466  
(87)国際公開日 平成4年(1992)2月6日  
(31)優先権主張番号 9015910.4  
(32)優先日 1990年7月19日  
(33)優先権主張国 イギリス(GB)  
(81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, SE), J P, US

(71)出願人 ユニベルシテ リブル ドゥ ブリュッセル  
ベルギー国, B-1050 ブリュッセル, ア  
ベニュー フランクリン ルーズベルト,  
50  
(72)発明者 ブルトワ ミシェル  
ベルギー国, B-1180 ブリュッセル, ア  
ベニュー ドゥ ラ フロリド 23  
(72)発明者 ポレン アレックス  
ベルギー国, B-1701 イッテルベーグ,  
ガースペークストラート 65  
(74)代理人 弁理士 植木 次之 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ベルオキシダーゼの予防および治療への応用

(57)【要約】 (修正有)

エンヴェロープ・ウイルス感染症とくに単純疱疹ウイルスおよびヒトの免疫不全ウイルス感染症の予防および治療用薬剤の製造のためのベルオキシダーゼの予防的および治療的応用。該薬剤は、薬学的に許容されるキャリヤ中にベルオキシダーゼ、基質、および過酸化物を含む。該薬剤のベルオキシダーゼは、ラクトベルオキシダーゼおよびミエロベルオキシダーゼを含む。該薬剤は、それを必要とする人のために、薬学的に許容されるキャリヤとともに、局部、経口、および注射投与用に処方される。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453 (2)

吉澤式の範囲図

1. エンヴェロープ・ウイルス感染症の予防または治療用薬剤の製造のためのペルオキシダーゼの使用。
2. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、さらに、該ペルオキシダーゼに特定の酸素供与体および酸化作用のある基質がエンヴェロープ・ウイルス感染症の予防または治療用薬剤の製造のためにしようされることを特徴とする使用。
3. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、該ペルオキシダーゼがラクトペルオキシダーゼであることを特徴とする使用。
4. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、該エンヴェロープ・ウイルスが单纯疱瘡ウイルスであることを特徴とする使用。
5. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、該エンヴェロープ・ウイルスがヒトの免疫不全ウイルスであることを特徴とする使用。
6. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、該酸素供与体が過酸化水素であることを特徴とする使用。
7. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、酸素供与体が基質および該基質に特定の酵素を含む酵素系であり、それによって過酸化水素が形成されることを特徴とする使用。
8. 特許請求の範囲第7項に記載の使用において、さらに、該酵素系の基質がグルコースであり、該酵素系の酵素がグルコース・オキシダーゼであることを特徴とする使用。
9. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該酸素供与体が無機過酸化物であることを特徴とする使用。
10. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該酸素供与体が有機過酸化物であることを特徴とする使用。
11. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該酸素供与体が微生物であることを特徴とする使用。
12. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該酸化作用のある基質がチオシアネット塩であることを特徴とする使用。
13. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該酸化作用のある基質が塩化物、臭化物、ヨウ化物からなるグループから選ばれたハロ

25. エンヴェロープ・ウイルスの予防または治療のための方法において、特許請求の範囲第1項または第2項に記載の薬剤の治療または予防に有効な量がそれを必要とする患者に投与されることを特徴とする方法。
26. 特許請求の範囲第25項に記載の方法において、さらに、該エンヴェロープ・ウイルスが単純疱瘡ウイルスであることを特徴とする方法。
27. 特許請求の範囲第25項に記載の方法において、さらに、該エンヴェロープ・ウイルスがヒトの免疫不全ウイルスであることを特徴とする方法。
28. 特許請求の範囲第25項に記載の方法において、さらに、該薬剤が局部用薬剤であることを特徴とする使用。
29. 特許請求の範囲第25項に記載の方法において、さらに、該薬剤が口腔内薬剤がき類であることを特徴とする使用。
30. 特許請求の範囲第25項に記載の方法において、さらに、該薬剤が注射できる組成物であることを特徴とする使用。

- ゲン化合物であることを特徴とする使用。
14. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、さらに、該ペルオキシダーゼが哺乳動物のペルオキシダーゼであることを特徴とする使用。
  15. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、さらに、該ペルオキシダーゼがミエロペルオキシダーゼであることを特徴とする使用。
  16. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、さらに、該ペルオキシダーゼが植物のペルオキシダーゼであることを特徴とする使用。
  17. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該基質がチオシアネット塩であり、該ペルオキシダーゼが哺乳動物のペルオキシダーゼであることを特徴とする使用。
  18. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該酸化作用のある基質が塩化物、臭化物、ヨウ化物からなるグループから選ばれたハロゲン化合物であり、該ペルオキシダーゼが植物のペルオキシダーゼまたはミエロペルオキシダーゼであることを特徴とする使用。
  19. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該酸化作用のある基質がチオシアネット塩であり、該酸素供与体がグルコース基質およびグルコース・オキシダーゼを含む酵素系であり、該ペルオキシダーゼがラクトペルオキシダーゼであることを特徴とする使用。
  20. 特許請求の範囲第2項に記載の使用において、さらに、該酸化作用のある基質がチオシアネット塩であり、該酸素供与体がグルコース基質およびグルコース・オキシダーゼを含む酵素系であり、該ペルオキシダーゼがミエロペルオキシダーゼであることを特徴とする使用。
  21. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、さらに、該薬剤が局部用薬剤であることを特徴とする使用。
  22. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、さらに、該薬剤が口腔内薬剤がき剤であることを特徴とする使用。
  23. 特許請求の範囲第1項に記載の使用において、さらに、該薬剤が注射できる組成物であることを特徴とする使用。
  24. エンヴェロープ・ウイルスの予防または治療用薬剤の調製のため方法において、特許請求の範囲第1項または第2項の組成物が薬学的に許容されるキャリアと組み合わされることを特徴とする方法。

明細書

ペルオキシダーゼの予防および治療への応用

発明の分野

本発明は、ペルオキシダーゼの予防および治療への応用とウイルス性伝染病の予防法および治療法ならびに特にペルオキシダーゼ薬剤の予防および治療への応用と単純疱瘡ウイルスやヒト免疫不全症ウイルスなどのエンヴェロープ・ウイルスの伝染病の予防と治療にこの種薬剤を利用するための方法に関する。

発明の背景

エンヴェロープ・ウイルスとともに単純疱瘡ウイルス(HSV)やヒト免疫不全症ウイルス(HIV)がもつ細胞への潜在的な毒性を予防し抑制するために有効な予防および治療用薬剤の開発は、まだ確かで問題が多い。

単純疱瘡ウイルス(HSV-1, HSV-2など)は、その存在が広く認められる。単純疱瘡ウイルスによる伝染病の予防および治療のために開発された予防薬および治療薬ならびに予防法および治療法は、一般的にいって、まだ部分的にしか成功していない。

ヒトの乳に含まれる各種分泌物に抗ウイルス作用があることは以前から知られている〔マシュー・ズ・ラセット「Lancet」3:1388-1390(1976)、マイケルズ、R.H.「J. Immunol.」1:194:262-271(1954)、レグリード・ラセット「Pediatr. Scand.」175:696-701(1986)、アイザックス・ラセット「J. Infect. Dis.」1954:969-971(1986)参照〕。とくに、ヒトの全乳は、単純疱瘡ウイルス2に對して「in-vitro」で抗ウイルス中和作用を示すことが認められている。〔ローベズ・ラセット「Arch. Fr. Pediatr.」J46:263-265(1989)〕。この抗ウイルス作用が何に起因しているかについてはいくつかの説があるが、まだ確定的な説明は得られていない。

乳の抗ウイルス作用の種たる原因是、従来、主としてそこに含まれる免疫グロブリン(IgG)の存在によるものとされてきた。この抗ウイルス作用をもたらす物質としては、他にも、熱に対して比較的安定性のある卵白質高分子(マシュー・ズ・ラセット、マイケルズ、いずれも上記)および/または分子量が400,000ドルトンの分子(レグリード・ラセット、上記)および/またはカプセルに包まれたウイルスのみに作用する脂質成分(アイザックス・ラセット、上記)であるとする説がある。このように乳の抗ウイルス作用の原因物質を特定できないために、乳あるいはその成分あるいはそのシステムを抗ウイルスの目的に使用することにはおのずから

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453 (3)

限界がある。

ヒトの唾液も、また、単純疱瘡ウイルス1を含む多くのウイルスに対する作用をもつことが以前から知られている。【ジセリンク他「J. Infect. Dis.」117:583-586(1978)参照】。概念ながら、ヒトの唾液の抗ウイルス作用が何に起因しているかについてもまだ確定的な説明が得られておらず、著蛋白質【チーナー他「Immunol.」198:59-63(1986)】、免疫グロブリンA【トマシ「J. clin. Invest.」42:1552-1560(1963)】、あるいは免疫グロブリンG【ジセリンク他、上記書】に起因するものとするなどさまざまな説がある。最近では、さらに、抗ウイルス作用は、ウイルス中和作用によるものではなく細胞はご作用によるものではないか、すなわち、唾液が口腔上皮細胞に直接作用して細胞をウイルスの感染から防ぐのではないかという説も出されている。【ハイネマン、H. S. 及びM. S. グリーンバーグ「Archs. Oral. Biol.」25:257-261(1980)参照】。概念ながら、唾液の抗ウイルス作用が何に起因するかもまだ明かとはなっていない。

単純疱瘡ウイルスによる感染およびそれがもつ細胞への潜在的な毒性をあらゆる段階で予防し抑制することに成功した東洋は存在しない。

ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)は、最近になってやっとその存在が確認されたウイルスであるが、致命的で広範に存在するウイルスである。これらHIVウイルスの生化学および生理学的特性はまだほとんど知られていない。「in-vitro」ではヒトの全唾液と1時間半以上接触させることによってヒト免疫不全症ウイルス(HIV)のフィトヘムアグルチニンで刺激されたリンパ球を感染させる能力が抑制されるという報告がある。【フルツ「Lancet」1:1215(1986)】。しかし、培養時間がそれより短い場合には、顕著な抑制作用は認められない【フルツ、上記書参照】。さらに、報告された唾液の資料のすべてがHIV-1の伝染性の100%の抑制を保証しているわけではない【フォックス他「JADA」118:709-711(1989)参照】。

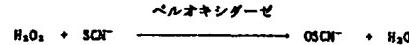
現在までのところ、知り得る限りにおいて、HIVの感染およびその細胞への潜在的な毒性の予防および治療に常に成功することを立証した薬剤あるいは方法は存在しない。

予防と治療がとくに困難なエンゲローブ・ウイルスとして、他にも、各種痘瘡ウイルス(水痘-帯状疱瘡ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、

ヒト痘瘡ウイルス6など)、パラミクソウイルス(ヒトのパラインフルエンザウイルスなど)、オルトミクソウイルス科のウイルス(AおよびB型インフルエンザウイルスなど)、ロータウイルス、コロナウイルス、レトロウイルス(ヒトのT細胞白血病ウイルス、ウシの白血病ウイルス、サルの免疫不全症ウイルスなど)などが挙げられる。

唾液の大半の自然の外部分泌物には自然の抗菌作用物質が含まれていることはよく知られている。とくに、自然に発生し唾液や乳中に存在することが知られる抗菌性的チオシアネット／ペルオキシダーゼ/H2O2系は、広範に研究が行なわれている。

唾液中には抗菌性的ペルオキシダーゼ依存系が存在することが確認されており、これは、下記のようにハイポチオシアナイト(次亜チオシアノ酸塩)(OSCN-)を生成することができる。



【オラム、レイター「Biochem. J.」100:373-381(1966)、ホッグ、ジャゴ「Biochem. J.」117:779-790(1970)】、カールソン他「Infect. Immun.」44:581-586(1984)】。唾液中に存在すると考えられており、この系の中でチオシアネットを酸化するペルオキシダーゼは、

唾液ペルオキシダーゼおよびラクトペルオキシダーゼを含む。乳の中にも同様な抗菌性的ラクトペルオキシダーゼ依存系が存在することが確認されている。【オラム、レイター「Biochem. J.」100:373(1966)】。実際、唾液中で機能するチオシアネット／ペルオキシダーゼ／過酸化水素系は、乳の中での両側に機能する。

【クレベーフ、S. J. 他「J. Dent. Res.」34:88(1965)】。

「in-vitro」では、ペルオキシダーゼ／チオシアネット／過酸化水素系が細胞に寄り添い／または骨周組織を破壊する原因となることが知られている若干の細胞に対して抗菌効果をもつことが示されている。【カールソン、上述書、コートイス他「J. Dent. Res.」68(special issue):1002(1989)参照】。この系の抗菌効果は、また、頬面粘膜のアフタ性外傷の症例では「in-vivo」でも実証されている。【フージェンドーン、ビエッセンス「J. Oral Pathol.」16:425-427(1987)】。

概念ながら、チオシアネット／ペルオキシダーゼ／過酸化水素系の抗菌メカニズムはまだ正確には確認されていない。しかし、生理的pHでは、(この系で生成される)ハイポチオシアナイト(次亜チオシアノ酸塩)が細菌の必須アミの酸および酵素のSH基の酸化に介在して細菌の活動を抑制すると考えられている。さらに、ラクトペルオキシダーゼが同じく細菌の活動を抑制する抗菌作用があるとみられるシアノアセチル酸などチオシアネット・イオンの高級オキシ酸の形成にかかわっているとの説もある。【ビヨルク、L. O. クレッソン「J. Dairy Sci.」63:919-921(1980)、ホッグ他、上記書、ブルット他「Biochemistry」21:562-567(1982)】。

チオシアネット／ペルオキシダーゼ／過酸化水素過酸化水素系を含んだロ剤で活性化される抗菌性薬品が既に知られている。ロ剤に投与されると、この種の抗菌性薬品が口腔内の自然の化学的環境中の(歯垢および/または水など)各種構成物質によって活性化されることになる。とくに、ペリコ他に与えられたアメリカ合衆国特許第4,564,519号(以下ペリコ'519と呼ぶ)は、2-酔素型の唾液ロ剤活性化抗菌薬品が開示している。この前書きは、チオシアネットとラクトペルオキシダーゼを含み、この中、ラクトペルオキシダーゼは、薬品が口腔中の他の酵素系によって形成される過酸化水素との相互作用によって、ハイポチオシアノ酸(次亜チオシアノ酸)(HOSC)を用いた歯基の平衡溶液中に存在する歯の一層のハイポチオシアナイト(次亜チオシアノ酸)イオン(OSCN-)の形をとる細胞抑制物質を生成する。

またモントゴメリー他に与えられたアメリカ合衆国特許第4,576,817号には、消毒用のために抗菌性酵素を利用した包帯およびガーゼが開示されている。このガーゼは、酵素を利用しての具を唾液と接触させて過酸化水素を生成する目的で、歯科で活性化されるオキシドレグクターゼ(過酸化水素酵素)を含んでいる。ある実験例では、この種の抗菌性包帯はラクトペルオキシダーゼなどの過酸化性ペルオキシダーゼも含むように構成されている。

ジャーナル「BIOFUTURE」(1990年2月、52ページ)には、共創すると各種感染症の治療に有用とおもわれる有効な遮離基を生成する2つの酵素を有する系が開示されている。この系は、グルコースの存在下でH2O2を生成するグルコース・オキシダーゼを含むものである。この系は、また、H2O2とともに細胞にとって毒性の高いヨード化合物も含んでいる。概念ながら、この毒性の正確なメカニズムは

まだわかっていない。このジャーナルの中では、さらに、このグルコース・オキシダーゼ／ペルオキシダーゼ系がCandida albicansに対する單クローリング抗体と結合された場合にマウスのこの種感染症の予防に効果があったことが報告されている。このグルコース・オキシダーゼ／ペルオキシダーゼ系は、また、HIVのgp120フラクションのエピトープ用單クローリング抗体と結合された場合にこのエピトープを表すSacharomycesの感染症に効果があったことも報告されている。

ジャーナル「CLINICAL RESEARCH Vol.38, No.5(1988)809A」には、「in-vitro」では、ラクトペルオキシダーゼ-ヘログラン化物-過酸化水素(LHHP)系が呼吸器シンシチウム・ウイルス(RSV)の自己複製に効果があったことが報告されている。また、ミエロペルオキシダーゼ-ヘログラン化物-ペルオキシダーゼ系(炎症によって摂食されたバクテリアに対するホストの防御メカニズムの中で重要な役割を果たす)が、RSVに対するホストの防御においてもある役割を果たしているのではないかという説も出されている。

最後に、PCT特許出願第WO 8912457号の中には、マクロファージのレベルでヒトの自然の抗体活動を補強するためにミエロペルオキシダーゼをキャリヤーと合わせたものをヒトに投与することが開示されている。この開示では、精製したミエロペルオキシダーゼをマクロファージに親和力を有するキャリヤーと結合させ、キャリヤーがミエロペルオキシダーゼをマクロファージが抗体防御のためにそれを補足して利用するところまで述べようとしている。開示されているキャリヤーには、マクロファージに親和力を有する抗体あるいはその断片が含まれている。他に利用できるキャリヤーとしては、特殊なリボソームおよびヒトの血清アルブミンが示されている。好ましくは、ミエロペルオキシダーゼおよびそれと結合されたキャリヤーが、DNA組み替え技術を利用して形成される。このような組成物が、人体の自然の抗体防御機能を助け、高め、補強するために与えられ、また、HIVを含めて各種伝染病の機能に有用であると考えられている。

ペルオキシダーゼとチオシアネット／ペルオキシダーゼ／過酸化水素系の性質に關しては、それぞれに以前からいろいろなことが知られています。また、エンゲローブ・ウイルス(とくに、単純疱瘡およびヒトの免疫不全症ウイルス)による感染症の予防および治療のための予防薬および治療薬が求められているにもかかわらず、われわれの知る限り、今まで、エンゲローブ・ウイルスによる感染症の予防および治療のために、またとくに、単純疱瘡ウイルスおよびヒトの免

‘**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453 (4)

免疫不全ウイルスによる感染症の予防および治療のために、ペルオキシダーゼまたは過酸化物系を組み込んだ薬剤を利用したものはない。

したがって、HSVおよびHIVを含めてエンゲローブ・ウイルスによる感染症を予防しました／または治療する予防用および治療用ペルオキシダーゼ薬剤に対するニーズ、ならびに、それらに対する効果作用を有する基質、酸素供与体、あるいはペルオキシダーゼを自然に発生する濃度で選るのではなく、それらを必要としている人々に投与できるようにペルオキシダーゼを予防および治療のための薬剤に応用することへのニーズが存在すると考えられる。最後に、そのようなペルオキシダーゼ薬剤をそれを必要としている人々に予防および治療に効果のある量だけ投与することによって、HSVおよびHIVを含むエンゲローブ・ウイルスの感染症を予防し治療する方法に対するニーズも存在する。

発明の概要

本発明の主要な目的は、エンゲローブ・ウイルスの予防および治療のための薬剤の処方（製造）にペルオキシダーゼを使用（応用）する用途を提供することである。

本発明の他の目的は、単純痘ウイルスおよびヒトの免疫不全ウイルスを含めてエンゲローブ・ウイルスの感染症を予防および治療するための薬剤にペルオキシダーゼを予防および治療の目的で応用する用途を提供することである。

本発明のさらに主要な目的は、ペルオキシダーゼ薬剤をそれを必要としている個人に予防および治療に効果のある量だけ投与することによってウイルスに対する予防および治療法を提供することである。

本出願に開示しては、「予防」という用語は、エンゲローブ・ウイルスとくにHSVおよびHIVの感染症を予防するおよび／または予防に役立つ薬剤、量、方法、用途、作用等に關してさまざまに使用される。また、本出願に開示しては、「治療」という用語は、エンゲローブ・ウイルスとくにHSVおよびHIVの感染症を改善する薬剤、量、方法、用途、作用等に關してさまざまに使用される。

本発明が教えるところにもとづいて、ここには、単純痘ウイルスおよびヒトの免疫不全症ウイルスを含めてエンゲローブ・ウイルスの感染症を予防し治療するための薬剤中にまたペルオキシダーゼ薬剤の投与の方法にペルオキシダーゼを予防および治療の目的で応用する用途が開示されている。

不全ウイルスなどのエンゲローブ・ウイルスの感染症の予防および治療の方法が開示される。この方法は、本発明のペルオキシダーゼ薬剤をそれを必要とする人に予防および治療に効果のある量だけ投与することを含むものである。

以上の目的および本発明の他の目的は、添付の図面を参照して行なう以下の説明から明らかとなろう。

図面の簡単な説明

第1図は、HSV-1を本発明の薬剤のペルオキシダーゼ／オシアネート／過酸化水素系で培養した20分、30分、および120分後に得られた結果を示す線グラフである。

第2図は、本発明の薬剤のペルオキシダーゼ／オシアネート／過酸化水素系で培養した後に上清中の培養リソバ球中のHIV生成p24の成長に關して得られた結果を示す線グラフである。

第3図は、本発明の薬剤のペルオキシダーゼ／オシアネート／過酸化水素系で培養した後に10°の細胞ごとのp24の細胞間成長に關して得られた結果を示す線グラフである。

第4図は、ラクトペルオキシダーゼとミエロペルオキシダーゼでの検定結果を示した棒グラフである。

発明の詳細な説明

本発明のペルオキシダーゼ薬剤は、一種類のペルオキシダーゼを含むものである。好ましくは、ペルオキシダーゼ薬剤は、HSVおよびHIVを含むエンゲローブ・ウイルスに対して抗ウイルス性を示すペルオキシダーゼ／酸化可逆性基質／酸素供与体系を含むものである。これらの抗ウイルス性薬剤にあっては、ペルオキシダーゼが酸素供与体（過酸化物）による基質（ハロゲンまたはガハロゲン）の酸化の触媒作用を果たして、負の電荷をもつ一価の酸化化合物を形成する。この薬剤は、求めあるいは必要に応じて、HSVおよびHIVなどのエンゲローブ・ウイルスの感染症の予防および／または治療のためにそれを必要としている人にその予防および／または治療に効果的な量を投与できるように、予防および／または治療の目的で処方することができる。

本発明のペルオキシダーゼ薬剤は、また、パラミクソウイルス、オルトミクソウイルス科のウイルス、ロータウイルス、コロナウイルス、発疹ウイルス（帯状水痘ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヒト痘ウイルス6など）

本発明の好ましいペルオキシダーゼ薬剤（以下、「ペルオキシダーゼ組成物」または単に「組成物」と呼ぶことがある）とは、それだけでほぼ必要物を備えた抗ウイルス系で、その利用者が、自然に発生する「*in vivo*」化合物あるいはその複合物に依存しないでも作用するものである。この薬剤には、好ましくは過酸化水素を生成するグルコースーグルコース・オキシダーゼ酵素系である酸素供与体、たとえばラクトペルオキシダーゼのようなペルオキシダーゼ、ハロゲンおよびガハロゲンからなるグループから選ばれた基質が含まれる。これらペルオキシダーゼ薬剤は、それを比較的短期間投与しただけでもHSVおよびHIVなどのエンゲローブ・ウイルスの予防および治療に効果があるよう用力される。好ましくは、これら各種成分の複数および／または処方は、酸素供与体およびペルオキシダーゼ生成される化合物の生成を最大し、同時に酸素供与体の濃度をペルオキシダーゼの活動を妨害しないレベルに維持するように選ばれる。

本発明のペルオキシダーゼ薬剤は、種々のオシアネート／ペルオキシダーゼ系の各種成分を含み、またややそれを模倣する形にすることが好ましいことが認められている。そのような処方が好ましいのは、その成分がヒトの外分泌物の純粋な成分であるためである。このような処方は、さらに、その各種成分のいずれかによって食管の吸収が増進するために薬剤の抗ウイルス作用がいつぞ高められることからも好ましい。

したがって、本発明は、最も好ましくは、それだけでは必要物を備えて次亜オシアネートを生成する予防および治療用のペルオキシダーゼ／オシアネート／過酸化水素系であって、エンゲローブ・ウイルスの感染症の予防および治療のために利用者が自然に発生するその「*in vivo*」の内臓複合物に依存することなく適用あるいは利用できる薬剤を提供するものである。

本発明のペルオキシダーゼ薬剤によって予防および／または治療されるエンゲローブ・ウイルスには、他に、パラミクソウイルス（ヒトのパラインフルエンザウイルスなど）、オルトミクソウイルス科のウイルス（AおよびB型インフルエンザウイルスなど）、ロータウイルス、コロナウイルス、発疹ウイルス（帯状水痘ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、ヒト痘ウイルス6など）、レトロウイルス（ヒトのT細胞白血病ウイルス、ウシの白血病ウイルス、サルの免疫不全症ウイルスなど）が含まれる。

さらに、本発明が教えるところにもとづけば、単純痘ウイルスやヒトの免疫

、レトロウイルス（ヒトのT細胞白血病ウイルス-1、ウシの白血病ウイルス、サルの免疫不全症ウイルスなど）などのエンゲローブ・ウイルスの感染症に対する予防および治療の用途に關しても有効である。

本発明の薬剤の基質は、負の電荷をもつハロゲン、その誘導体、負の電荷をもつギヤロゲン、およびその誘導体で構成されるグループから選ばれる。「ハロゲン」という用語は、当該技術に熟達した人には周知の通り、元素周期表のV族に属する元素の負の電荷をもつ一価の状態のものを指し、臭化物、塩化物、およびヨウ化物を含む。「ギヤロゲン」という用語は、負の電荷をもつ一価のイオンおよびイオン化合物を指す。本発明の「ギヤロゲン」は、ナトリウムチオシアネート、カリウムチオシアネート、アンモニウムチオシアネート、鉄(III)チオシアネートなどのチオシアネート塩およびその混合物を含む。これらの基質およびその誘導体は、自然の物質（たとえば、唾液およびヒトの乳）から抽出（選択）することもできるし、また自然のまたは化学的方法で生成することもできる。これらは、いずれも、当該技術に熟達した人には周知のものである。

本発明の薬剤中のペルオキシダーゼは、酸素供与体による基質の酸化の触媒作用を果たして、酸化化合物を生成する。これらのペルオキシダーゼには、セイヨウウツバビのペルオキシダーゼのような植物の（植物性）ペルオキシダーゼ、ならびに、唾液ペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、好酸性ペルオキシダーゼなどのような哺乳類のペルオキシダーゼが含まれる。本発明の薬剤に用いられるペルオキシダーゼは、当該技術に熟達した人には周知の方法および手法によって、セイヨウウツバビ唾液から抽出されるペルオキシダーゼなどのように「たとえば、マンソンーラテムツラ他「*Biochemistry*」27:233-239(1988)に記載されているように」、あるいはまた、乳の誘導体（牛乳乳酸）から抽出されるラクトペルオキシダーゼやリンバ球から生成されるミエロペルオキシダーゼなどのように、自然の環境から抽出することができる。これらのペルオキシダーゼは、やはり当該技術に熟達した人には周知のように、DNA組み替え技術によって生成されるペルオキシダーゼ（ミエロペルオキシダーゼを含む）をも含むものである。

【本出願に開示しては、「国際単位」という用語は、pH 7および25°Cで、毎分、1マイクロモルの基質の触媒作用を行なう酵素の量を指す。酵素は、グラムまたはミリグラムの適当ないずれか一方を用いて「1U」（国際単位）で濃度を示す。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453 (5)

(2) ラクトペルオキシダーゼ	チオシアネート、ヨウ化物
(3) ミエロペルオキシダーゼ	塩化物、ヨウ化物、チオシアネート
(4) セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ	塩化物、ヨウ化物
(5) 植物ペルオキシダーゼ	塩化物、ヨウ化物、臭化物

下の表ⅠBには、(酸素供与体からの過酸化物一本出発の説明に関しては過酸化水素の存在下で)次亜ハログン酸塩または次亜チオシアント酸塩化合物を生成するための本説明の表IAの代表的な酵素系の反応を示す。

表ⅠB

(1 a) 噴液ペルオキシダーゼがチオシアネートと過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜チオシアント酸塩と水を生成する。
(1 b) 噴液ペルオキシダーゼがヨウ化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜ヨウ素酸塩と水を生成する。
(2 a) ラクトペルオキシダーゼがチオシアネートと過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜チオシアント酸塩と水を生成する。
(2 b) ラクトペルオキシダーゼがヨウ化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜ヨウ素酸塩と水を生成する。
(3 a) ミエロペルオキシダーゼが塩化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜塩素酸塩と水を生成する。
(3 b) ミエロペルオキシダーゼがヨウ化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜ヨウ素酸塩と水を生成する。
(3 c) ミエロペルオキシダーゼがチオシアネートと過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜チオシアント酸塩と水を生成する。
(4 a) セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼが塩化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜塩素酸塩と水を生成する。
(4 b) セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼがヨウ化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜ヨウ素酸塩と水を生成する。
(5 a) 植物ペルオキシダーゼが塩化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働

たレーベルを付け、乾燥した状態または液状で供給される。】

ラクトペルオキシダーゼは、精蛋白質で、商品としては、乳から得られた凍結乾燥した粉末状のものが市販されている。この市販のペルオキシダーゼは、30国際単位(以下IUで表すことがある)の活性があり、L-チロシン・ヨウ素化に関しては93,000の分子量があると推定される。ラクトペルオキシダーゼの物理化学的性質としては、分子量78,100、部分比体積0.74、ヘム/分子1.0などが知られている。

噴液ペルオキシダーゼは、精蛋白質で、唾液または耳下腺の臓器から得ることがができる。噴液ペルオキシダーゼの化学的特性は、よく知られていない。しかし、噴液ペルオキシダーゼの物理化学的性質としては、分子量が約80,000-100,000の範囲にあることなどが知られている。

ミエロペルオキシダーゼも、やはり精蛋白質である。市販されているものの中には(アメリカ合衆国ミズーリ州セントルイスのSIGMA社)、0.02Mの酢酸ナトリウム緩衝剤から凍結乾燥したヒトのリンパ球から得られるミエロペルオキシダーゼがある。この市販されているものは、40-100IUの活性がある。

セイヨウワサビのペルオキシダーゼも、精蛋白質である。市販されているものの中には(アメリカ合衆国ミズーリ州セントルイスのSIGMA社)、基本的に塩を含まないものもある。この市販されているものは、固体mg当たり250-330単位の活性がある。この商品の予備的研究では、その中に2つの塩基性アインチームが含まれており、酸性のアインチームは含まれていないことが示されている。【ここで用いられる「単位」という用語は、pH6および20°Cで20秒間に1.0mgのブルプロガリンを生成するセイヨウワサビのペルオキシダーゼの量を指す。このブルプロガリン(20秒)の単位は、25°Cで毎分約1.8uM単位と等価である。】

表IAには、本発明の薬剤で利用する好みペルオキシダーゼ/基質の組み合わせの例を示す。

表IA

ペルオキシダーゼ	基質
(1) 噴液ペルオキシダーゼ	チオシアネート、ヨウ化物

いて、次亜塩素酸塩と水を生成する。

(5 b) 植物ペルオキシダーゼがヨウ化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜ヨウ素酸塩と水を生成する。

(5 c) 植物ペルオキシダーゼが臭化物と過酸化水素の相互作用の触媒として働いて、次亜臭素酸塩と水を生成する。

本発明の酸素供与体は、薬剤中で基質の酸化に必要な過酸化物(たとえば、過酸化水素)を供給する。

好みしくは、酸素供与体は、基質、その基質に特徴の酵素、および水および/または酸素および/または水素などの必要な反応物質を含む酵素系である。代わりに、本発明の薬剤においては、(過酸化水素の形で)過酸化物を供給するために過酸化酵素あるいは一般には乳酸菌と呼ばれている乳酸桿菌などの微生物を利用することもできる。この種乳酸菌の具体的な例としては、Lactobacillus casei, Streptococcus faecalis, Streptococcus mutansなどを挙げることができる。この種の微生物(細菌)の使用は、局部使用の歯科クリームとして使用するため処方される薬剤ではとくに好ましい。

本出版では、また、無機過酸化物(たとえば、過酸化ナトリウム、過酸化マグネシウムなど)または有機過酸化物(たとえば、過酸化ベンジル、過酸化尿素など)の使用も考えられる。また、反応すると過酸化水素と生成する薬品の使用も考えられる。また、過酸化水素自身を酸素供与体として使用することもできる。実際にには酸素供与体として使用するか、投与のための薬剤の处方を含むいくつかの要因によって異なってくる。

最も好みしくは、酸素供与体は、酸化可能な基質、その基質に特徴の酸化還元酵素、および酵素および/または水などの必要な反応物質を含む酵素系である。そのような酸化可能な基質およびそれに特徴の酸化還元酵素の例は、ペリコ色に与えられたアメリカ合衆国特許第4,564,519号(以下、ペリコ'519と呼ぶ)に挙げられている。下の表IIAには、いくつかの例を示す。

表IIA

酸化可能な基質	酸化還元酵素	他の反応物質
---------	--------	--------

(a) B-D-グルコース	グルコース・オキシダーゼ	水、酵素
(b) D-ガラクトース	グルコース・オキシダーゼ	酸素
(c) 尿素	尿素オキシダーゼ	水、酵素
(d) コリン	コリン・オキシダーゼ	酸素
(e) D-アミノ酸 <sup>1</sup>	D-アミノ酸オキシダーゼ	水、酵素
(f) D-グルタミン酸塩	D-グルタミン酸塩オキシダーゼ	水、酸素
(g) グリシン	グリシン・オキシダーゼ	水、酵素
(h) グリコレート	グリコレート・オキシダーゼ	水、酵素
(i) L-ソルボース	L-ソルボース・オキシダーゼ	水、酵素
(j) 第一級アルコール	アルコール・オキシダーゼ	
(k) 第一級アミン	アミン・オキシダーゼ	
(l) NAD(P)H	NAD(P)Hオキシダーゼ	

<sup>1</sup> D-アミノ酸は、プロリン、メチオニン、イソロイシン、アラニン、バリン、およびフェニルアラニンのD-異性体を含む。

表IIAの代表的な酵素系が過酸化水素を生成する反応を表IIBに示す。

表IIB

(a) グルコース・オキシダーゼがペーター-D-グルコース、水、および酵素の相互作用の触媒として働いて、過酸化水素とグルコン酸を生成する。
(b) ガラクトース・オキシダーゼがD-ガラクトースと酵素の相互作用の触媒として働いて、過酸化水素とD-ガラクトースヘキソーゼアルドーゼを生成する。
(c) 尿素オキシダーゼが尿素、水、および酵素の相互作用の触媒として働いて、過酸化水素、アラントイン、および二酸化炭素を生成する。
(d) コリン・オキシダーゼがコリンと酵素の相互作用の触媒として働いて、過酸化水素とベタイン・アルデヒドを生成する。
(e) D-アミノ酸オキシダーゼがプロリン、メチオニン、イソロイシン、アラニン、バリン、およびフェニルアラニンのD-異性体ならびに水および酵素の相互作用の触媒として働いて、過酸化水素、アンモニア、およ

THIS PAGE IS A FILLER PAGE

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453 (6)

び対応するアルファーケト酸を生成する。  
 (f) D-グルタミン酸塩オキシダーゼがD-グルタミン酸塩、水、および酵素の相互作用の触媒として働いて、過酸化水素、アンモニア、および2-オキシグルタタン酸塩を生成する。  
 (g) グリシン・オキシダーゼがグリシン、水、および酵素の相互作用の触媒として働いて、過酸化水素、アンモニア、およびグリオキシリノ酸を生成する。

特定の出典から引用して表II Aに示した代表的な酸化還元酵素の特性は、ペリゴ' 519に述べられているが、そこに説明されている関連する特性を、本出版の一節として以下に引用する。

最も好ましくは、本発明のペルオキシダーゼ薬剤は、ラクトペルオキシダーゼまたはエロペルオキシダーゼのいずれかをオシアネット(SCN<sup>-</sup>)基質およびグルコース/グルコース・オキシダーゼ酵素系酵素供与体と組み合わせたものを含んでいる。

上に述べたペルオキシダーゼ/基質/過酸化水素系は、好ましくは、使用者の自然に発生する「in vivo」での基質、酵素供与体、ペルオキシダーゼ、および他の成分の濃度にほぼ依存することなく適用あるいは使用できるそれだけでは必要物を備えた系として「in vivo」で使用する予防および治療用薬剤中に処方される。

本発明のペルオキシダーゼ薬剤の有効性が、当該薬剤が投与される自然に発生する環境によって生じることも明らかにされている。たとえば、ヒトの口の中では、過酸化水素の濃度は生物学的生産および唾液の流れの正回数として変化する。自然の事象としてあるいは何らかの医療処置から生じた事象として唾液の流れが低いレベルにあるときは、カリウム・オシアネットやペルオキシダーゼなどの各種成分の口内濃度はそれに対応して低下する。このことが、こんどは、薬剤が投与されたときにその予防および治療効果を制限する既定要因になり得るであろう。さらに、ペルオキシダーゼの口内濃度が唾液の流れの低下によって抑えられるとき、過酸化水素の口内濃度が閾値まで上昇し、そのため過酸化水素が薬剤のペルオキシダーゼの作用を妨害するおそれがある。

したがって、上に記した薬剤中の基質、酵素供与体、およびペルオキシダーゼの濃度は、過酸化水素とペルオキシダーゼの濃度を調和させて過酸化水素の濃度

をそれによってペルオキシダーゼの作用が妨害されないレベルに制限するよう開拓しなければならない。

【ここで使用する限りにおいて、ミリモルという用語は、薬剤の分子量に対応するグラムでの量を1000で割ったものを意味する。】

酵素供与体が過酸化水素自身である場合には、それは、通常本発明の薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約2ないし300ミリモルの量で、また好ましくは薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約3ないし300ミリモルの量で存在する。

酵素供与体が酸化可能な基質とその基質に特定の酸化還元酵素である場合には、酸化可能な基質は、通常ペルオキシダーゼ薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.01ないし0.6ミリモルの量で、また好ましくは薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.03ないし0.1ミリモルの量で存在し、また、酸化還元酵素は、通常薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.5ないし500IUの量で、また好ましくは薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約1.0ないし40IUの量で存在する。

酵素供与体が無機または有機過酸化物である場合には、その過酸化物は、通常薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.000006ないし0.6ミリモルの量で、また好ましくは薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.00006ないし0.006ミリモルの量で存在する。

基質は、通常薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.000006ないし0.01ミリモルの範囲の量で、また好ましくは薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.00006ないし0.006ミリモルの範囲の量で存在する。

基質がオシアネット塩(ギハログン)である場合には、それは、通常薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.0001ないし0.01ミリモルの範囲の量で、また好ましくは薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.001ないし0.006ミリモルの範囲の量で存在する。薬剤の効力にあたっては、酵素の作用を抑制または延長する金属化合物の使用を避けるように注意しなければならない。

基質がギハログンである場合には、それは、通常薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.000006ないし0.006ミリモルの量で、また好ましくは薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.00006ないし0.006ミリモルの量で存在する。

ペルオキシダーゼは、通常薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.01

ないし50IUの量で、また好ましくは薬剤1グラムまたは1ミリリットル中に約0.2ないし4.0IUの量で存在する。

のぞましい場合には、ペルオキシダーゼ薬剤は、「in vivo」での使用のためにペルオキシダーゼによって生成される抗ウイルス性化合物を得る目的で、ある系の化合物の1つまたは化合物の組み合わせの自然に発生する「in vivo」濃度に依存するような系として処方できることが明らかにされている。

本発明のペルオキシダーゼ薬剤の抗ウイルス性予防および治療効果は、本発明の薬剤の処方によって生成される化合物の濃度に依存する。これら化合物の生成される濃度は、1マイクロモルから100ミリモルまでの間で変化するが、5マイクロモルから1ミリモルの間の濃度が好ましい。この値を達成するために、酵素供与体および/または基質の濃度に対するペルオキシダーゼ単位の濃度は、広い範囲で変化させることができる。

水の存在は、本発明のペルオキシダーゼ薬剤の酸化/還元反応を促進する。水は、また、ある種の反応では反応物質である。したがって、好ましくは、前記薬剤の処方にあたっては、薬剤に最大限の安定性と保存寿命を与えるために、水の使用を比較的低濃度にとどめる。

薬剤の中で活性化された酵素系の生成物が弱い有機酸を含む場合には、薬剤を有機酸を中和する緩衝剤とともに処方すると有利である。適当な緩衝剤の一つは、重炭酸ナトリウムである。

この点に関して、本発明のペルオキシダーゼ薬剤は、生理的pHにほぼ近似するpHを示すように処方することが好ましい。具体的には、本発明のペルオキシダーゼ薬剤は、4.5から6.5の範囲のpHを有することが好ましく、6から6.5の範囲のpHを示すことがよくに好ましい。

それだけで必要物を備えた活性の薬剤として処方するためには、薬剤の成分をいっしょに処方の中に入れ、しかもその成分の少なくともいくつかは使用時まで互いに化学的に分離された状態に保たれるようにすべきである。たとえば、ペルオキシダーゼ、酵素供与体(酵素供与体酵素系または微生物)は、行動の自由を拘束しあるいはマイクロカプセルに入れ、それらが使用されるときまで互いに反応し合わないようにすることもできる。上に記した系のいかなる物質もいずれかの成分によって破壊あるいは化学反応を抑制されることがなければ、薬剤は、単純なウイルスおよびHIVを含めてエンゲロープ・ウイルスに作用する。

本発明のペルオキシダーゼ薬剤は、特定の状況下での投与にとって好ましい任意の適当な方法で、薬学的に許容されるキャリヤとともに処方することができる。たとえば、薬剤を口内感染症の治療に経口投与する場合(チューブインガム、うがい液、ペースト状供みがき、スプレー、葉用ドロップ、食べられるポンポンなど)として処方することもできる。あるいは、薬剤をそれを必要とする人の皮膚、目、毛など局部に投与するための局部処方薬(スプレー、ゲル、クリーム、点眼液、シャンプーなど)としておよび/または包帯またはガーゼに組み込んで処方することもできる。最後に、薬剤を体内投与用の注射液として処方することもできる。

本発明の薬剤を局部、経口、あるいは注射用処方として調製し包装するための方法、機器、および加工処理技術は、当該技術分野では開発が進んでおりましたよく知られている。

本発明の薬剤のペルオキシダーゼ/基質/過酸化水素系は、このような処方に組み込むのに適している。しかし、本出版に記載されている酵素は、強い剪断力や高い温度などの条件下では劣化し不活性化するおそれがある。したがって、酵素が薬剤の処方の他の成分と混ざり合って完成品になる期間中、加工処理条件は、いかなる長期間でも温度が5°C以上に上昇しないように制御しなければならない。

保存の安定性を高めるために、本発明の薬剤のペルオキシダーゼの処方および調製で行なわれる混和は、ほぼ自由な水のない状態で行ない。また、完成品は、できるだけ空気および水分に曝さないように包装しなければならない。

本発明のペルオキシダーゼ薬剤は、以下に説明する例によってさらによく理解されよう。ただし、これらの例は、あくまで説明のためのものであって、いかなる意味でも本発明の範囲を超過するものではない。

実施例1

以下の表IIIは、チューブインガム、嚥める錠剤、葉用ドロップなどの経口投与用包みとして処方されるペルオキシダーゼ薬剤用の薬学的に許容されるキャリヤの基礎处方例を示したものである。

表III	重量(%)
------	-------

SEARCHED  INDEXED  COPIED 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453(7)

成分	(a)	(b)	(c)	(d)
ソルビトール、	75	—	95	25
結晶状コーンシュガー	—	75	—	75
ガムベース	25	25	—	—
香料	1	1	1	1
着色剤	0.5	0.5	0.5	0.5
防腐剤	—	—	0.5	0.5
サッカリン、ナトリウム	0.005	—	0.005	—

表IV中、处方(a)および(b)は、チューインガムの形での薬学的に許容されるキャリヤを示し、处方(c)および(d)は、經剤および適用ドロップの形での薬学的に許容されるキャリヤを示している。これらの处方の中で、ナトリウム・サッカリンはアスパルテームで置換できる。

以下の各例は、本発明にもとづく経口投与で予防および治療に効果のある量を供給するための組みがきの調整に使用できる各種成分およびそれらの濃度を示したものである。

表IV	重量(グラム)		
	4A	4B	4C
<b>チューインガム</b>			
ソルビトール、結晶状	75	75	75
ガムベース	25	25	25
グリセロール	5	5	5
香料	1	1	1
着色剤	0.5	0.5	0.5
重炭酸ナトリウム	0.5	0.5	0.5
	100.0	100.0	100.0
<b>ペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系</b>			

カリウム・チオシアネート	—	0.01 g	0.005 g
ナトリウム・チオシアネート	0.01 g	—	—
アスコルビン酸ナトリウム	—	0.01 g	—

表VI	重量(グラム)		
	6A	6B	6C
<b>適用ドロップ</b>			
ソルビトール、結晶状	97	97	97
グリセロール	1	1	1
香料	1	1	1
着色剤	0.5	0.5	0.5
重炭酸ナトリウム	0.5	0.5	0.5
	100.0	100.0	100.0
<b>ペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系 (適用ドロップ100gあたり)</b>			
グルコース・オキシダーゼ	10,000 IU	—	—
B-Dグルコース	1.0 g	—	—
コリン・オキシダーゼ	—	—	2,000 IU
コリン	—	—	0.5 g
尿酸塩オキシダーゼ	—	10,000 IU	—
尿酸塩	—	0.75 g	—
ラクトペルオキシダーゼ	200 IU	300 IU	1,500 IU
カリウム・チオシアネート	—	—	0.01 g
ナトリウム・チオシアネート	0.05 g	0.08 g	—

(チューインガム100gあたり)	40,000 IU	—	—
グルコース・オキシダーゼ	1.0 g	—	—
B-Dグルコース	—	8,000 IU	—
コリン・オキシダーゼ	—	1.0 g	—
コリン	—	—	2,500 IU
D-グルタミン酸塩オキシダーゼ	—	—	0.1 g
D-グルタミン酸塩	—	—	4,000 IU 1,500 IU 1,000 IU
ラクトペルオキシダーゼ	4,000 IU	1,500 IU	1,000 IU
カリウム・チオシアネート	0.01 g	0.005 g	—
ナトリウム・チオシアネート	—	—	0.01 g

表V	重量(グラム)		
	5A	5B	5C
<b>チューインガム</b>			
ソルビトール、結晶状	43	43	43
ガムベース	20	20	20
グリセロール	25	25	25
香料	1	1	1
着色剤	0.5	0.5	0.5
重炭酸ナトリウム	0.5	0.5	0.5
	100.0	100.0	100.0
<b>ペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系 (チューインガム100gあたり)</b>			
D-アミノ酸オキシダーゼ	5,000 IU	—	—
D-アラニン	0.1 g	—	—
グルコース・オキシダーゼ	—	20,000 IU	2,000 IU
B-D-グルコース	—	0.5 g	0.5 g
ラクトペルオキシダーゼ	500 IU	2,500 IU	1,000 IU

表VI	重量(グラム)		
	7A	7B	7C
<b>適用ドロップ</b>			
ソルビトール、結晶状	80	80	80
コーンシュガー	17	17	17
香料	1	1	1
着色剤	0.5	0.5	0.5
重炭酸ナトリウム	0.5	0.5	0.5
	100.0	100.0	100.0
<b>ペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系 (適用ドロップ100gあたり)</b>			
グルコース・オキシダーゼ	—	6,000 IU	1,000 IU
B-Dグルコース	—	0.5 g	1 g
D-グルタミン酸塩オキシダーゼ	10,000 IU	—	—
D-グルタミン酸塩	0.05 g	—	—
ラクトペルオキシダーゼ	1,500 IU	2,000 IU	1,000 IU
カリウム・チオシアネート	0.001 g	0.005 g	—
ナトリウム・チオシアネート	—	—	0.005 g

実施例II

下の表図は、クリームまたはゲル状あるいは包帯またはガーゼに組み込んで局部的に投与する局部用薬剤として処方されるペルオキシダーゼ薬剤用の薬学的許容されるキャリヤの基礎処方例を示したものである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特表平6-501453 (B)

表VII  
表VIII

表VII 中、处方 (a) は、グルの形での薬理学的に許容されるキャリヤを示しており、处方 (b) は、クリームの形での薬理学的に許容されるキャリヤを示している。

以下の各表は、本発明にもとづく局部用ペルオキシダーゼ薬剤の開発に使用できる各種成分およびそれらの予防および治療に効果のある量を示したものである。

成分	重量 (%)	
	(a)	(b)
脱イオン水	19.02	20.0
コーンスターク <sup>1</sup>	38.04	—
Lubrajel DV <sup>2</sup>	38.04	—
アロエ・ヴェラ	0.000021	—
Natrosol 250M <sup>3</sup>	0.1	—
キシリトール	4.76	—
Cirami N. 1 <sup>4</sup>	—	20.0
ひまわり油	—	40.0
ビタミンE	—	0.05
Tensami 4/07 <sup>5</sup>	—	2.0
Tensami 1/05 <sup>6</sup>	—	3.0
Bronopol <sup>7</sup>	—	2.0
Myacide SP <sup>8</sup>	—	2.0
プロピレン・グリコール	—	10.0

<sup>1</sup> ここに使用するコーンスタークの例としては、フランス、モントルーユのアルパン・ミュラー・インターナショナル社がIFTAR TPPの商品名で販売している水素処理をしたスターク紙が挙げられる。

<sup>2</sup> Lubrajel D は、フランス、モントルーユのアルパン・ミュラー・インターナショナル社が販売しているグリセリンとアクリル樹脂である。

<sup>3</sup> Natrosol 250M は、アメリカ合衆国バージニア州ホーブウェルのアクアロン社が販売しているヒドロキシエチレンセルロースである。

<sup>4</sup> Cirami N. 1, Tensami 4/07, Tensami 1/05, Bronopol, Myacide SP は、すべて、フランス、モントルーユのアルパン・ミュラー・インターナショナル社が販売している製品名である。

成分	重量 (%)	
	9A	9B
<b>グル</b>		
脱イオン水	19.02	19.03
コーンスターク	38.054	38.054
Lubrajel DV	38.054	38.054
アロエ・ヴェラ	0.001	0.001
Natrosol 250M	0.1	0.1
キシリトール	4.76	4.76
	100.00	100.00
<b>ペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系 (グル100gあたり)</b>		
グルコース・オキシダーゼ	10,000 IU	—
B-Dグルコース	1.0 g	—
コリン・オキシダーゼ	—	8,000 IU
コリン	—	1.0 g
ラクトペルオキシダーゼ	200 IU	1,500 IU
カリウム・チオシアネット	—	0.005 g
ナトリウム・チオシアネット	0.05 g	—

本発明のペルオキシダーゼ薬剤のための薬理学的に許容されるキャリヤの基礎处方例を示したものである。

成分	重量 (%)		
	10A	10B	10C
<b>クリーム</b>			
脱イオン水	21.51	21.51	21.51
Cirami N. 1	20.0	20.0	20.0
ひまわり油	40.0	40.0	40.0
ビタミンE	0.04	0.04	0.04
Tensami 4/07	2.0	2.0	2.0
Tensami 1/05	3.0	3.0	3.0
Bronopol	2.0	2.0	2.0
Myacide SP	2.0	2.0	2.0
プロピレン・グリコール	10.8	10.0	10.0
	100.0	100.0	100.0
<b>ペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系 (クリーム100gあたり)</b>			
グルコース・オキシダーゼ	5,000 IU	—	—
B-Dグルコース	0.5 g	—	—
D-アミノ酸オキシダーゼ	—	5,000 IU	—
D-アラニン	—	0.1 g	—
尿酸塩オキシダーゼ	—	—	10,000 IU
尿酸塩	—	—	0.75 g
ラクトペルオキシダーゼ	2,000 IU	500 IU	200 IU
カリウム・チオシアネット	0.005 g	—	—
ナトリウム・チオシアネット	—	0.01 g	0.08 g

実施例Ⅲ

下の表Xは、点膜または洗膜として局部的に投与する洗膜液用に処方され

成分	重量 (%)	
	(a)	(b)
ソルビン酸、0.0025%	—	0.0002
清浄水	99.4	98.1
ホウ酸	0.018	0.0176
ホウ酸ナトリウム(10H <sub>2</sub> Oで水和)	0.0015	—
塩化ナトリウム	0.0025	—
塩化ペンザルコニウム <sup>9</sup>	0.0001	—
重エデン酸ナトリウム <sup>10</sup>	0.001	—
重エデン酸ナトリウム <sup>9</sup> および重エデン酸ナトリウム <sup>10</sup> は、保存剤として添加してある。	—	—

以下の各表は、本発明にもとづく洗膜液の開発に使用できる各種成分およびそれらの予防および治療に効果のある量を示したものである。

成分	洗膜液 <sup>11</sup> 5mlあたりの量	
	(a)	(b)
グルコース・オキシダーゼ	2,500 単位 <sup>12</sup>	—
グルコース	20 ミリグラム	—
ラクトペルオキシダーゼ	150,000 ABTS単位 <sup>13</sup>	—
カリウム・チオシアネット	200 マイクログラム	—
洗膜液 <sup>11</sup> は、ホウ酸90ミリグラム、水和(10H <sub>2</sub> O)ホウ酸ナトリウム6.6ミリグラム、ビタミンA 2500単位、0.0025%のソルビン酸0.125μgの5ml	—	—

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453 (8)

溶解である。

この例に用いられる限り、グルコース・オキシダーゼの「単位」とは、pH 5.10および37°Cで3.0ミリグラムのグルコースを酸化してグルコン酸とするグルコース・オキシダーゼの量を指す。検定条件は、フィンランドのフィニッシュ・シュガーリー社の検定方法F S 250に示されている。この例では、グルコース・オキシダーゼ1ミリグラムは、pH 5および37°Cで100-120単位の活性を示す。

この例に用いられる限り、「ABTS単位」とは、pH 5および37°Cで1分間にATBS基質[2,2'-アゾノ-6-(3-エチルベンズチアソリン-6-スルホン酸)]の酸化の触媒作用をするラクトベルオキシダーゼの量を指す。検定条件は、マンソンラテムグリ化[Biochemistry Vol. 27:233-239ページ(1988)]に記載されている。この例では、ラクトベルオキシダーゼ1ミリグラムは、pH 5および37°Cで600ABTS単位の活性を示す。

組成物は、2つの部分に分けて処方され、使用に先立って組み合し、よく振って2つの部分が溶けで混ざり合うようにする。

第1の部分は、ラクトベルオキシダーゼとグルコース・オキシダーゼの混合物である。第2の部分は、ホウ酸、水和ホウ酸ナトリウム( $10\text{ H}_2\text{O}$ )、ビタミンA、0.0015%のアスコルビン酸、カリウム・チオシアネット、水、グルコースの5mL1溶度である。この5mL溶液(第2の部分)は、第1の部分と混ぜ合わせ、よく振って粉末が溶けるようにする。投与は、通常の点滴液と同様にして行なう。

実施例IV

内部(注射)投与用の注射組成物(溶液)として処方されるペルオキシダーゼ薬剤のための薬理学的に許容されるキャリヤの基礎処方例を示す。この基礎組成物は、塩化ナトリウム0.15モルとリン酸ナトリウム0.6ミリモルの緩衝液(pH)である。この組成物に、ミクロベルオキシダーゼ30単位を加え、溶液を混ぜて試料を調製する。【この例に用いられている限りにおいて、単位とは、オートマニアシンを使用して室温で1分間に470nmで吸光度1単位を増大させる触媒作用を果たすために必要な酵素の量を指す。クラウイックス社[Gastroenterology Vol. 87:1344-1350ページ(1984)参照。上の意味では、1マイログラムは1単位に等しい。】

ら3番目の細胞に対する毒性の規定濃度にして、これを各実験およびコントロールのベースラインにとった。

次に、上の表XVに示したペルオキシダーゼの処方を等量のベースライン規定濃度のHVS-1ブレント液と混ぜ合わせた(1mL/1mL)。

これらウイルスとペルオキシダーゼ処方の混合物を、37°Cで30分、60分、および120分孵育した。次に、これら混合物を1から10のフォールドに希釈し、5の倍数間隔的に濃度が減少する懸濁液を得た。これらの懸濁液の各々から50マイクロリットルを試料としてとり、「in vitro」で育てたフィロプロラストの層に授種した。接種後、細胞の培養液を7日間検査した。細胞に対する毒性の評価を次の要領で半定量的に行なった。0から25%までを1+、25から50%までを2+、50から75%までを3+、75から100%までを4+。

コントロールは、酸化作用のある半分を等量のHBSS緩衝液で置換して安定させた。逆に、ブランクは、処方の完全な酸化系を保持したが、ウイルスの半分は成長培養で置換された。

予備処理されたウイルスの細胞に対する毒性をペルオキシダーゼ処方と接触させなかった懸濁液のウイルスと比較した。この比較の結果は下記のように表した。

1. 効果なし： すなわち、実験とコントロールの間に細胞に対する毒性の差はない。

2. 遅延効果： 細胞に対する毒性の発現前に誘導期が最低24時間延ばされた場合。

3. 抑制効果： ウイルスの細胞に対する毒性の完全な抑制が認められた場合。

HVS-1ブレルの2.0の試料の各々を5つの道段希釈で分離させ(1.0-4から1.0-8)て、ペルオキシダーゼ処方と混ぜ合わせて処理した。これらの試料を等しい数のコントロールと比較し、その結果をプロットしたのが図1である。

図1を見てわかるように、ペルオキシダーゼ処方の存在下で120分の孵育によってHVS-1の細胞に対する毒性の潜在力が完全に抑制された。60分および30分の孵育では、それぞれ、完全な抑制の2/3および1/3、遅延の1/3および1/6の効果が得られた。しかし、オキシダーゼ処方と30分だけ孵育

次に、この薬剤の予防または治療に効果のある量(たとえば、約0.5mL)を、必要としている患者に投与する。すましくは、この投与は、筋肉内注射によって行なう。

同じ療法を通常認められているような噴霧療法を適用してスプレーで使用してもよい。

実施例V

この例は、本発明のペルオキシダーゼ薬剤のペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系のエンゲロープ・ウイルスとともに単純痘ウイルス-1に対する効果を示すものである。ペルオキシダーゼ薬剤のペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系は、下の表XVIに示す処方を用いて調製される。

表XII

成分	緩衝液 <sup>a</sup> 100mLあたりの量
グルコース・オキシダーゼ	0.02 ミリグラム
グルコース	1.20 ミリモル
SCN-	0.06 ミリモル
ラクトベルオキシダーゼ	4.00 ミリグラム

<sup>a</sup> この緩衝液は、カルシウム、マグネシウム、グルコースを含んでいないハングの均衡塩濃度である。緩衝液のpHは7.4である。HBSS緩衝液の内容物の重量は、次の通り。蒸留水1000mLごとに：NaCl-8グラム、KCl-0.4グラム、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>-0.06グラム、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.06グラム。

舌、鼻咽頭部、および外陰部の滲出液から4株のHSV-1ウイルスが得られた。これらの試料をブールし、次に、免疫吸収法を用いて型の決定を行なってH SV-1とした。その後、MRCS細胞および成長胚芽内で増殖させた。遠心分離によって細胞と細胞デbrisの分離を行なった。次に、ウイルスをアリコートにして液体窒素罐で貯蔵した。

次に、HIV-1のブールの試料を10から10のフォールドに希釈し、下か

した試料の1/2では、細胞に対する毒性の損失は認められなかった。

混合物の最高濃度(H)を検定したとき、少數の例では、酸化作用のある半分によるフィロプロラスト層に対する直接の毒性を避けることができなかった。しかし、その後の希釈(すなわち、H x 10-1)の間にこの毒性は認められなくなり、したがってウイルス自身の毒性の既に混乱を生じることはなかった。

それでも、実験結果はウイルスの細胞に対する毒性力の明確な低下を示している。これは、時間依存的であるように思われる。

実施例VI

この例は、本発明のペルオキシダーゼ薬剤のペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系のエンゲロープ・ウイルスとともにヒトの免疫不全ウイルスに対する効果を示すものである。ペルオキシダーゼ薬剤のペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系は、下の表XVIに示す処方で調製された。

表XIV

成分	緩衝液 <sup>a</sup> 100mLあたりの量
グルコース・オキシダーゼ	0.02 ミリグラム
グルコース	1.20 ミリモル
SCN-	0.06 ミリモル
ラクトベルオキシダーゼ	4.00 ミリグラム

<sup>a</sup> この緩衝液は、カルシウム、マグネシウム、グルコースを含んでいないハ

ングの均衡塩濃度である。緩衝液のpHは7.4である。HBSS緩衝液の内容物の重量は、次の通り。蒸留水1000mLごとに：NaCl-8グラム、KCl-0.4

グラム、Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>-0.06グラム、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.06グラム。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453(10)

HIVアリコートは、ARV-4細胞系の表面部分から得た。次に、これらのアリコートをすぐに等量の表XIVに示したペルオキシダーゼ処方と混ぜ合わせ、37°Cで1時間から2分間孵育した。

次に、HIVとペルオキシダーゼ処方の混合物をフィトヘムアグルチニンで測定したヒトのリンパ球の培養物に接種した。アリコートの最高希釈度は、1:20、1:100、および1:200であった。ウイルスを懸濁液のみの中で予備孵育してコントロールを得た。培養物には、1日目に、再び新鮮なリンパ球を供給した(図2の矢印)。ウイルスの成長は、細胞内(10<sup>3</sup>の細胞毎に)または表面部分のいずれかでELISAを用いてp24を検出してモニターした。

コントロールの実験では、ウイルスは、最終希釈度1:20および1:100でヒトのリンパ球に接種したとき、初期に細胞内p24を生成した。しかし、1:200の希釈度では、p24の生成が遅延し、その量も少なかった。それに比して、ペルオキシダーゼ処方で処理したウイルスは、1:20の希釈度でも少量のp24しか生成しなかった。図2および3は、これらの実験の結果をまとめて示したものである。

15日目に、リンパ球の培養物は、1:200で希釈されたウイルスを接種したコントロールで10<sup>3</sup>毎に90pgのp24を生成したが、ペルオキシダーゼ処方で1時間処理した後1:20に希釈したウイルスを接種したものでは25pgしか検出されなかつた。これより高い希釈度のものでは、10<sup>3</sup>の細胞内でp24は検出されなかつた。しかし、10<sup>3</sup>の細胞の培養物は、p24がその後に表面部分にこぼれたために全体が感染粒子によって汚染された。

コントロールの実験のウイルスがもたらした細胞変性効果は、リンパ球をペルオキシダーゼ処方のみで処理した後は観察されなかつた。それに比して、混合物からSNCを除外すると(したがってH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の蓄積を許す)、最も低い希釈度(1:20)でも細胞に対する毒性があることが証明された。

2分、10分、20分、30分、および60分の予備孵育で活力的実験を行なつた。希釈しないペルオキシダーゼ処方と2分間接触させるだけで、充分に試料のHIVの感染力の低下が認められた。

実施例VII

この例も、本発明のペルオキシダーゼ調剤のペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系のエンゲロープ・ウイルスとともにヒトの免疫不全ウイルスに対する効果を示す。

示すものである。この例で使用したペルオキシダーゼは、精製したヒトのミエロペルオキシダーゼを組み替えたものであつた。

MPO-MIXを調製した。このMPO-MIXは、500mlの培地(RPMI, Gibco、および5%胎児の子牛の血清、SeraLab)にナトリウム・チオシアネート(20mg/ml)、グルコース1%、グルコース・オキシダーゼ(6mU/ml)、および10から40mg/mlの精製したヒトのミエロペルオキシダーゼを組み替えたものを加えたものであつた。このヒトのミエロペルオキシダーゼを組み替えたものは、特許出願PCT/EP89/00588に記載されている方法を使用して生成された。しかし、このようなミエロペルオキシダーゼは、任意の適当なものから得られることを理解すべきである。

感染したHIV細胞すなわち1200TCID<sub>50</sub>(T細胞感染ドース50%)から得られたHTLVIIIIBウイルスの60mlウイルス懸濁液を調製した。

最後に、1.10<sup>3</sup>レポーター細胞Sup-T1を得た。とくに、ヒトのリンパ腫から得られたSup-T1細胞(J.ホーキー、アメリカ合衆国ペンシルヴェニア州フィラデルフィア、ベンシルヴェニア大学)が利用された。

以下に説明するような標準的な実験手順が用いられた。

HTLVIIIIBウイルスのウイルス懸濁液(60ml)をMPO-MIX(500ml)に加え、得られた混合物を37°Cで15分間孵育した。次に、混合物をSup-T1細胞のペレット(1.10<sup>3</sup>の細胞を含む)に移し、ゆっくりと回しながら37°Cで30分間孵育した。次に、細胞を培地(RPMIおよび胎児の子牛の血清)で2回洗浄し、ペレットにし、同じ培地、すなわち2.10<sup>3</sup>細胞/mlの細胞密度で再び懸濁させた。次に、これらの再懸濁させた細胞を37°Cで10日間培養した。

3日目、5日目、および7日に培養物の細胞検査(モニター)を行ない、syncytiaの形成などの細胞変性効果を記録した。10日目には、細胞培養物45mlが回収された。次に、この450mlの細胞培養物を、10% Triton X-100を含み使用前は-20°Cで保存されていた緩衝剤で処理した食塩水50mlと混ぜ合わせた。その後、試料をELISAで分析してp24 HTLVIIIIB抗原(ウイルスの子孫)を定量した。より正確には、選ばれたELISAは、HTLVIIIIBp24蛋白質を測定して、p24に対して育てられたマウスの单クローン抗体(アメリカ合衆国Dopant社)を一次抗体として使用し、ビオチンと呼ばれるヒトの抗HTLVIIIIB免疫グロブリンを二次抗体として使用する。streptavidin-セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ抱合体(Amersham)およびOPDA発色性基質(Sigma)を用いて具体的な複合が明

にされた。光学密度は、490nmと測定された。

下の表XVにこれらの実験の結果を示す。これらの結果は、10から40mg/mlの範囲の濃度でヒトのミエロペルオキシダーゼを組み替えたものを含む本発明のペルオキシダーゼ調剤が、HTLVIIIIBウイルスの複製を完全に抑制することを示している。

試験		ウイルスのMPOへの被覆後の培養日数				
		0	3	5	7	10
<b>1. ウィルスHTLVIIIIB</b>						
	+	CPE <sup>1</sup>	nd	—	—	—
MPO-MIX		ELISA <sup>2</sup>	nd	15	18	19
(10 mg/ml MPO)				13		
<b>2. ウィルスHTLVIIIIB</b>						
	+	CPE <sup>1</sup>	nd	—	—	—
MPO-MIX		ELISA <sup>2</sup>	nd	26	23	18
(20 mg/ml MPO)				19		
<b>3. ウィルスHTLVIIIIB</b>						
	+	CPE <sup>1</sup>	nd	—	—	—
MPO-MIX		ELISA <sup>2</sup>	nd	20	14	17
(40 mg/ml MPO)				13		
<b>4. ウィルスHTLVIIIIB</b>						
のみ		CPE <sup>1</sup>	nd	(+)	+	++
		ELISA <sup>2</sup>	nd	73	170	354
					1000	
<b>5. Sup-T1 細胞</b>						
	+	CPE <sup>1</sup>	nd	—	—	—
MPO-MIX		ELISA <sup>2</sup>	nd	18	23	19
(40 mg/ml MPO)				16		

(HTLVIIIIBなし)

6. ウィルスHTLVIIIIB

	CPE <sup>1</sup>	nd	(+)	+	↔	nd
MPO-MIX	ELISA <sup>2</sup>	nd	87	135	193	835
(40 mg/ml MPO)						

(グルコース・オキシダーゼなし)

7. ウィルスHTLVIIIIB

	CPE <sup>1</sup>	nd	(+)	+	↔	nd
MPO-MIX	ELISA <sup>2</sup>	nd	116	294	658	800
(MPOなし)						

<sup>1</sup> CPE(細胞に対する毒性作用) :

— syncytiaがまったく観察されなかつた。

± 若干の小さいsyncytiaが観察された。

++ → ++ syncytiaの数および大きさの増大が観察された。

<sup>2</sup> ELISA : ミリ単位OD490で表される。

表XVからわかるように、試料1、2、3では、syncytiaがまったく観察されず、ウイルスの複製の抑制が認められた。試料4では、syncytiaおよびウイルスの複製の両方で正の制御が認められた。試料5では、負の制御が認められ、検定物中にはウイルスが存在しなかつた。試料6では、MPO酵素にその基質の一つ(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)が欠如していた。したがって、ウイルスの複製に対する作用はまったく認められなかつた。最後に、試料7では、検定物中にMPOが存在していないので、ウイルスの複製に対する作用はまったく認められなかつた。

上の検定を全部合せてみると、ミエロペルオキシダーゼを適当な濃度で本発明の調剤のペルオキシダーゼ系に使用すればHTLVIIIIBウイルスの複製が完全に抑制されることが示されている。

実施例VIII

この例は、ペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系の抗ウイルス作用ならびにミエロペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系の性愛剤の危険テンジクネズミ・モザ

SEARCHED  
SERIALIZED  
INDEXED  
FILED

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

特表平6-501453 (11)

ル（腹内テングクネズ・モデル）における生殖器ウイルスに対する効果を示すものである全ウイルスに対する効果を示すものである。

20匹のハートリー・テングクネズミの腹内に1.05 p.f.uのHSV 2 MSウイルスを接種した。4日目から始めて24日目まで毎日連続してこれらのテングクネズミの発症病変状態（0から4までの尺度で）の発現および発達をモニターレ、下記の3種類のゲルのいずれか1つを用いて処置した。

1. 表IXの例9Aのゲルの処方通りのコントロール・ゲル（4匹のテングクネズミのグループ用）。

2. ラクトペルオキシダーゼの200IUではなくラクトペルオキシダーゼの88IU（ゲル100gあたり）を使用した以外は表IXの例9Aにしめた通りの処方で調製したラクトペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系を含むゲル（8匹のテングクネズミのグループ用）。

3. ラクトペルオキシダーゼの200IUではなくミエロペルオキシダーゼの70.8IU（ゲル100gあたり）を使用した以外は表IXの例9Aにしめた通りの処方で調製したミエロペルオキシダーゼ/基質/過酸化物系を含むゲル（8匹のテングクネズミのグループ用）。

発症の病変状態は、連続する2段階で発生した。第1の段階（一次感染）は、接種されたウイルスによるものであり、第2の段階（再発）は、神経細胞内に潜伏している状態で存在したウイルスの、多少とも顕著な、再活性化によるものである。

結果は、外部生殖器の周囲に現われた瘡瘍の病変部に0.6グラムのゲルを塗布することによって行なった。これらの実験の結果を表XVI（一次感染に対する処置の効果を示したもの）および表XVII（再発に対する処置の効果を示したもの）ならびに図4のグラフに示す。

表XVI

ゲル	平均重度 <sup>1</sup>	平均最高点	平均の一次感染の期間
1	12.7	3.5	11
2	7.4 ± 0.02 <sup>2</sup>	1.8 ± 0.03 <sup>2</sup>	6.5 ± 0.01 <sup>2</sup>
3	8.4 ± 0.02 <sup>2</sup>	1.9 ± 0.01 <sup>2</sup>	7.9 ± 0.05 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> 平均重度 = 4日目から12日までの点数の合計。

<sup>2</sup> 研究者の試験にもとづけば有意である。

表XVII

ゲル	平均再発数 <sup>1</sup>	平均の再発期間（日数）
1	1.6	4.3
2	1.4 N.S. <sup>2</sup>	3 N.S. <sup>2</sup>
3	1.9 N.S. <sup>2</sup>	3.3 N.S. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ここでは、連続する2日間に0.5 (erythema)に等しい点数を測定するかまたは1日に少なくとも1 (vesicle)に等しい点数を測定した場合に1つの再発となる。再発の前後には1日の病変のない日がある。

<sup>2</sup> 研究者の試験にもとづけば有意ではない。

表XVIおよび図4からわかるように、一次感染による病変部は、概して重さが高く（最高点2.5-3）、4日目から12-14日目まで続いた。一方、再発による病変部は、比較的軽度で（最高点0.5-1）、平均して3-4日後に消えた。これらの処置の結果は、ラクトペルオキシダーゼおよびミエロペルオキシダーゼを含んだゲルが一次感染の重さ、最高点数、および期間を有意に低減することを明らかに示している。

図2および図3の説明

図2は、リンパ球培養物中でHIVによって生成されたp24の成長を表面部分のp24を測定して得られた結果を示した図である。図3は、リンパ球培養物中でHIVによって生成されたp24の成長を10<sup>6</sup>の細胞ごとに細胞内のp24を測定して得られた結果を示した図である。

図2および図3に用いられている記号は、以下の通りである。実線（—）：緩衝液のみ中の予備時間1時間。網線（---）：酸化作用のある錯合体中の予備時間1時間。HIVの初期ブーストの最終的な希釈度：1:20 (●○)、1:100 (●□)、1:200 (▲△)。

以上の説明および例から、当該技術分野に通常程度に熟達している人には、本発明の精神および範囲から離脱することなく等価の変更を行なうことが可能なことは明らかであろう。

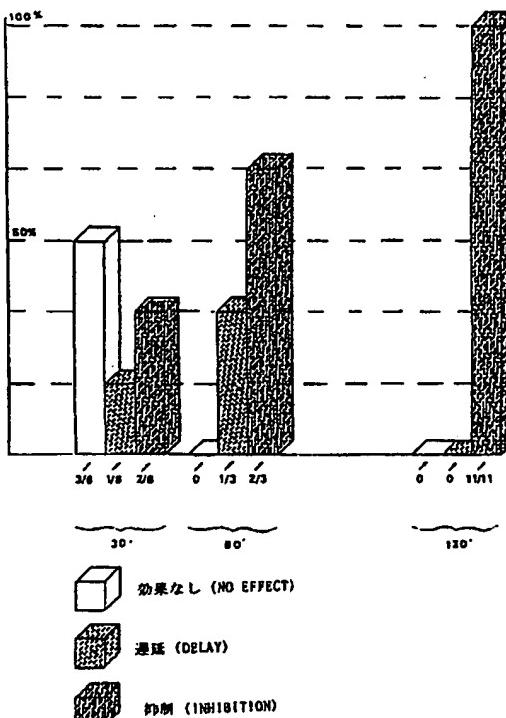


Figure 1.

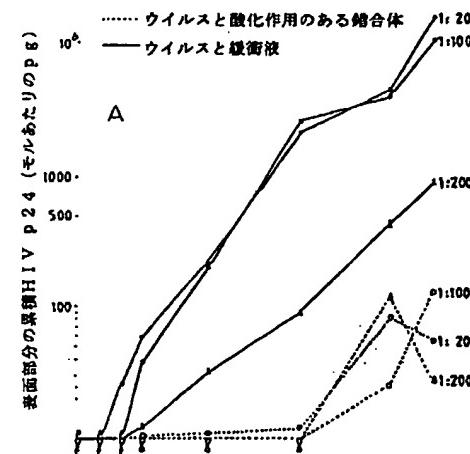


Figure 2

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

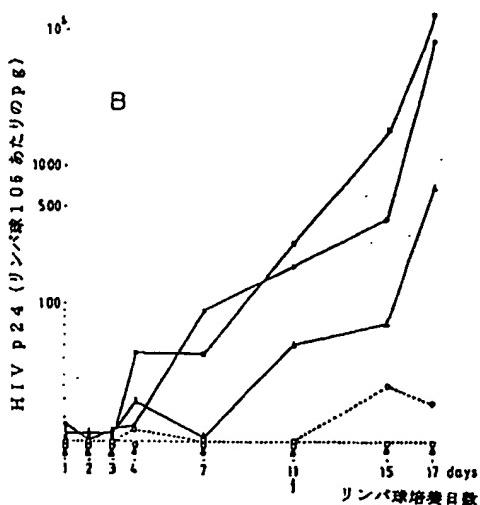
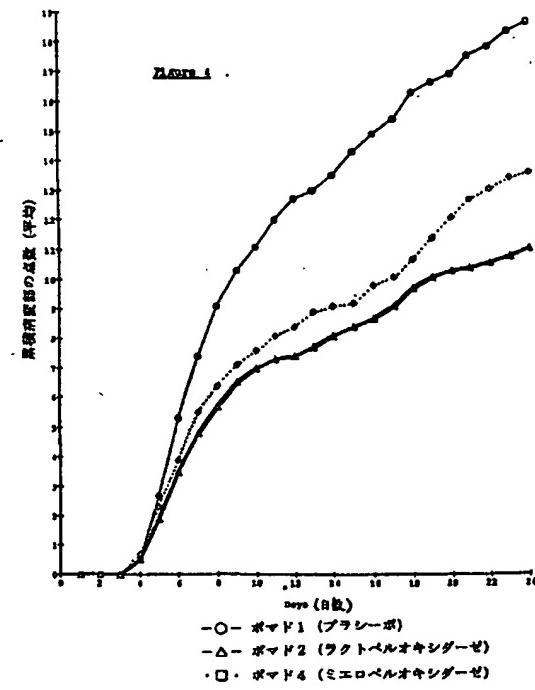


Figure 3



國語詞書錄

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No. PCT/DE 91/00048	
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC			
Int.Cl. 5 A 63 K 37/30 A 63 K 7/26			
II. FIELDS SEARCHED			
Mitsubishi Chemicals Incorporated			
Classification Scheme		Classification System	
Int.C1.5		A 63 K	
Documentations Searchable other than Mitsubishi Documentation in the Extent that such Documentaries are included in the Patent Search			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*			
Category *	Class or Reference, N = no indication, where appropriate of the relevant page(s)		Indication in Class N
X	EP,A,0361908 ((IDEON CORP.) 4 April 1990; see claims 1-5,10,21,14,15; page 4, lines 25-47; example 3		1-26
A	WO,A,8912657 ((UNIVERSITE LIGNE DE BRUXELLES) 28 December 1989; see claims 14-23; page 28, lines 10-30; page 5, line 1 - page 7, line 21 (cited in the application)		1-26
A	Chemical Abstracts, vol. 72, no. 15, 13 April 1970 (Columbus, Ohio, US) W. Balding et al.: "Novel polyisobutylene/vinylidene systems"; see page 129, abstract no. 76065g, & Sciences, 1970, 167(21918), 159-8		1-26
A	EP,A,0127603 ((IPARDO AG) 28 January 1987; see claims 1,7; page 2, lines 23-32; example 4 *** -/-		1-26
<p>* Special categories of cited documents:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-A' documents published in the named states of the area which to our knowledge do not contain patent claims;</li> <li>-D' documents disclosed from published or as after the International filing date;</li> <li>-E' documents which may have been filed as priority documents or which is cited to indicate the priority date of certain applications;</li> <li>-F' documents which may have been filed as priority documents or which is cited to indicate the priority date of certain applications relating to an oral communication;</li> <li>-G' documents published in the International filing day for the time that the priority was claimed;</li> <li>-H' documents published after the International filing day for the time that the priority was claimed or before publication of the International application;</li> <li>-I' documents published before the named inventors became entitled to protection under the Convention or before publication of the International application;</li> <li>-J' documents of another countries which claimed priority to the International application;</li> <li>-K' documents of another countries which claimed priority to the International application and which were published before the International application;</li> <li>-L' documents of another countries which claimed priority to the International application and which were published after the International application.</li> </ul>			
IV. CERTIFICATION			
Name of the Agent/Complaint of the International Search		Date of filing of the International Search Report	
O4-10-1991		05 NOV 1991	
International Searching Authority		Signature of International Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		Mme N. KUPER	

ALL DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		CONTINUED FROM THE PREVIOUS SHEET)	International Application No. PCT/BE 91/00048
Category -	Character of Document, with Author(s), where appropriate, of the relevant patent		Reference to Other Inv.
A	EP,A,0133738 ((LACLEDE PROFESSIONAL PRODUCTS, INC.) 5 February 1986, see claims 1,2,9,17 (cited in the application))		1-24
P, R	Chemical Abstracts, vol. 115, no. 7, 2 September 1991 (Columbus, Ohio, US) S.J. Weiszneroff et al.: "Virucidal effect of Lactobacillus acidophilus on human immunodeficiency virus type I: possible role in heterosexual transmission", see page 604, abstract 90322v, & J. Exp. Med. 1991, 174(1), 289-292		1-24

# **BEST AVAILABLE COPY**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 特表平6-501453 (13)

International Application No. PCT/BE91/00048		
FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		
<p><b>V. <input checked="" type="checkbox"/> OBSERVATION WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNREACHABLE *</b></p> <p>This International Search Report has not been concluded in respect of certain claims under Article 14(2)(b) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input checked="" type="checkbox"/> <b>Claim number:</b> 25-10 <b>Reason:</b> Because they relate to subject matter not required to be recorded by the Patent Office.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> <b>Claim number:</b> <b>Reason:</b> Because they relate to parts of the International application that do not comply with the substantive requirements in such an extent that no meaningful International Search can be carried out, adequately.</li> </ol> <p>3. <input type="checkbox"/> <b>Claim number:</b> <b>Reason:</b> Because they relate to parts of the International application that do not comply with the substantive requirements in such an extent that no meaningful International Search can be carried out, adequately.</p> <p>4. <input type="checkbox"/> <b>Claim number:</b> <b>Reason:</b> Because they are dependent claims and they are stated in contradicted ways.</p> <p><b>VI. <input type="checkbox"/> OBSERVATION WHERE LACK OF INVENTION IS INDICATED *</b></p> <p>The International Searching Authority has made indications in this International Search Report as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> All or several International search reports were already paid by the applicant, the International search report shows all incomplete parts of the International application.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> All or several of the International search reports have been already paid by the applicant, the International search report shows only those changes of the International application for which they were paid, respectively.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> The request for International search was not clearly paid by the applicant. Consequently, the International search report is returned to the International Office concerned in the name of the applicant by whom it was filed.</li> <li>4. <input type="checkbox"/> All or several claims could be examined without other consulting an additional file, the International Searching Authority did not make copies of any additional file.</li> </ol> <p>Remarks on Previous:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> The additional search data were communicated by supplementary patent.</li> <li><input type="checkbox"/> The present communication depends on additional search data.</li> </ul>		

Form PCT/ISA/010 (Supplements sheet 02) - PIH/423 2000

## 国際検索報告

EE 9100048  
SA 49101

This annex lists the patentability observations relating to the patent documents cited in the above-mentioned International search report.  
The annex may be reproduced in the European Patent Office (EPO) file as 3414997.  
The European Patent Office is in no way liable for those predictions which can easily give for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publishing date	Patent family numbered	Publishing date
EP-A- 0361908	04-04-90	AU-A- 4402589	18-04-90
		MO-A- 9003105	05-04-90
MO-A- 8912457	29-11-89	DE-A- 2332525	15-12-89
		CA-A- 0377653	18-08-90
		JP-T- 1501327	28-03-91
EP-A- 0127605	05-12-84	AT-A- 382078	12-01-87
		CA-A- 1211708	23-08-86
EP-A- 0123736	06-03-85	US-A- 4537766	27-08-85
		US-A- 4564519	14-01-88
		JP-A- 59231013	25-12-84

For more details about this annex 1 see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/82

フロントページの続き

(72) 発明者 モギルブスキー ニコル  
 ベルギー國, B-1150 ブリュッセル, リ  
 ュ ペ ドウクロワ 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 5 : <b>A61K 37/50, 7/28</b>		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 92/01466</b> (43) International Publication Date: <b>6 February 1992 (06.02.92)</b>
(21) International Application Number: <b>PCT/BE91/00048</b> (22) International Filing Date: <b>18 July 1991 (18.07.91)</b>		(74) Agent: COLENS, Alain; 21, rue Frans Merjay, B-1060 Bruxelles (BE).	
(30) Priority data: <b>9015910.4 19 July 1990 (19.07.90) GB</b>		(81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), DK (European patent), ES (European patent), FR (European patent), GB (European patent), GR (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), NL (European patent), SE (European patent), US.	
(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES [BE/BE]; 50, avenue Franklin Roosevelt, B-1050 Bruxelles (BE). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only) : POURTOIS, Michel [BE/BE]; 23, avenue de la Floride, B-1180 Bruxelles (BE). BOLLEN, Alex [BE/BE]; Gaasbeekstraat 65, B-1701 Itterbeek (BE). MOGUILÈVSKY, Nicole [FR/BE]; 4, rue P. Delacroix, B-1150 Bruxelles (BE).		Published <i>With international search report.</i>	

(54) Title: PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF PEROXIDASES

(57) Abstract

Prophylactic and therapeutic applications of peroxidases for the manufacture of medicaments for the prevention and treatment of enveloped virus infections and, in particular, of herpes simplex and human immunodeficiency virus infections. The medicaments include a peroxidase, a substrate and a peroxide in a pharmaceutically acceptable carrier. Peroxidases of the medicaments include lactoperoxidase and myeloperoxidase. The medicaments are formulated with pharmaceutically acceptable carriers for topical, oral and injectable administration to individuals in need thereof.

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	France	MN	Mongolia
BE	Belgium	GA	Gabon	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BG	Bulgaria	GN	Guinea	NL	Netherlands
BJ	Benin	GR	Greece	NO	Norway
BR	Brazil	HU	Hungary	PL	Poland
CA	Canada	IT	Italy	RO	Romania
CF	Central African Republic	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Congo	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SU+	Soviet Union
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	US	United States of America

+ It is not yet known for which States of the former Soviet Union any designation of the Soviet Union has effect.

-1-

## PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF PEROXIDASES

### Field Of The Invention

The present invention relates to prophylactic and therapeutic applications of peroxidases and methods for the prevention and treatment of viral infections and, in particular, to prophylactic and therapeutic applications of peroxidase medicaments, and methods for utilizing such peroxidase medicaments for the prevention and treatment of infections of enveloped viruses, such as the Herpes Simplex Viruses and the Human Immunodeficiency Viruses.

### Background Of The Invention

The development of effective prophylactic and therapeutic medicaments for preventing and inhibiting the cytotoxic potential of infections of enveloped viruses, and in particular of Herpes Simplex Viruses (HSV's) and Human Immunodeficiency Viruses (HIV's), have proven problematic.

Herpes Simplex Viruses (such as HSV-1 and HSV-2) are widespread. Prophylactic and therapeutic medicaments and methods developed for the prevention and treatment of infections of herpes simplex viruses have, in general, only been partially successful.

Secretions of human milk have long been known to exhibit antiviral activity [see Matthews et al., Lancet, 2: 1388-1390 (1976); Micheals, R.H., J. Immunol., 94: 262-271 (1964); Laegried et al., Acta Paedriatz Scand., 75: 696-701 (1986); and Isaacs et al., J. Infect. Dis., 154: 969-971 (1986)]. In particular, whole human breast milk has "in vitro" been noted to exhibit antiviral neutralizing activity against herpes simplex virus 2. [Lopez et al., Arch. Fr.

-2-

Pediatr., 46: 263-265 (1989)]. While the origins of this antiviral activity has been attributed to several varying sources, it has never been able to be definitively characterized.

The primary source of the antiviral activity of milk has been attributed to the presence of immunoglobins (IgG's) therein. Other sources that have been suggested as the origin of this antiviral activity includes a non-lipid macromolecule that is relatively stable to heat (Matthews et al., and Micheais, both *supra*) and/or a molecule having a molecular weight of 400,000 daltons (Laegried et al., *supra*) and/or a component of the lipid layer that effects only encapsulated viruses (Issacs et al., *supra*). This inability to definitely characterize the antiviral origin(s) of milk limits the use thereof, or of components or systems thereof, for antiviral purposes.

Human saliva has also long been known to be active against a number of viruses, including herpes simplex virus 1. [see Gyselink, et al., J. Infect. Dis., 137: 583-586 (1978)]. Unfortunately, the origin of the anti-viral activity of human saliva has not been definitively characterized, being ascribed variously to glycoproteins [Learner, et al., J. Immunol. 96: 59-63 (1966)], immunoglobulin A [Tomasi, J. clin. Invest. 42: 1552-1560 (1963)] or immunoglobulin G (Gyselink, et al., *supra*). More recently, it has further been suggested that the antiviral activity may be more of a cell-protective activity than a virus neutralizing activity -- that is to say, the saliva directly affects the oral epithelial cells, protecting them against infection [see Heineman, H.S., and M.S. Greenberg, Archs Oral Biol. 225: 257-261 (1980)]. Unfortunately, the origin of such activity still remains unknown.

-3-

No medicament has been successful in preventing and inhibiting infections of, and the cytotoxic potential of, herpes simplex viruses in all stages.

The human immunodeficiency viruses (HIV's) are fatal and widespread viruses that have only relatively recently been identified. The biochemistry and physiology of these HIV's are poorly known and understood. It has been reported that "in vitro" contact, for at least one-half hour or more, with whole human saliva inhibits the ability of human immunodeficiency virus (HIV) to infect phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. [Fultz, Lancet, 2:1215 (1986)]. However, shorter periods of incubation have failed to demonstrate an impressive antiseptic effect (see Fultz, supra). Moreover, not all of the saliva samples reported can insure a 100% inhibition of HIV-1 infectivity [see Fox et al., JADA, 118: 709-711 (1989)].

As yet, no medicaments or methods of which we are aware have proven to be consistently successful for preventing and treating infections of, and the cytotoxic potential, of the HIV's.

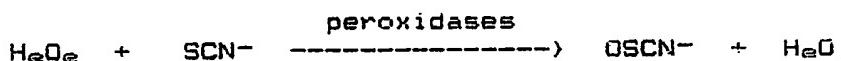
Other enveloped viruses that are particularly troublesome to effectively prevent and treat include other herpes viruses (such as Varicella-zoster virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and human herpes virus-6), the paramyxoviruses (such as human parainfluenza viruses), the family of orthomyxoviruses (such as the influenza type viruses A and B), rotaviruses, coronaviruses and retroviruses (such as Human T-cell leukemia virus-1, bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus).

It is well known that natural antimicrobial agents are

-4-

contained in most natural external mammalian secretions. In particular, the naturally-occurring antimicrobial thiocyanate/peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems present in saliva and in milk have been extensively studied.

In saliva, an antimicrobial peroxidase-dependent system has been described which can generate hypothiocyanite (OSCN<sup>-</sup>), as follows:



[Oram and Reiter, Biochem. J., 100:373-381 (1966); Hogg and Jago, Biochem. J., 117: 779-790 (1970); and Carlsson et al., Infect. Immun., 44: 581-586 (1984)]. The peroxidases thought to be present in saliva that oxidize thiocyanate in this system include salivary peroxidase and lactoperoxidase. A similar antimicrobial lactoperoxidase-dependent system has also been identified in milk. [Oram and Reiter, Biochem. J., 100:382 (1966)]. Indeed, it has been suggested that the same peroxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system that operates in saliva also operates in milk. [see Klebanoff, S.J., et al., J. Dent Res. (supp.) p.86 (1965).]

The antimicrobial efficiency of the thiocyanate/peroxidase/hydrogen peroxide system has been demonstrated "in vitro" against several bacteria known to be responsible for frequent destruction of teeth and/or periodontium [See Carlsson, supra, and Courtois et al., J. Dent. Res. 68 (spec. issue):1002 (1989)]. The antimicrobial efficiency of this system was also demonstrated "in vivo" in cases of aphthous lesions of the buccal mucosa [Hoogendoorn

-5-

and Piessens, J. Oral Pathol., 16: 425-427 (1987)].

Unfortunately, the precise antimicrobial mechanism of the thiocyanate/peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system has not been definitely characterized. However, it is believed that at physiological pH, hypothiocyanite (generated by this system) mediates the oxidation of essential proteins and enzymes sulfhydryl groups of the bacteria, resulting in microbial inhibition. Additionally, it has been suggested that lactoperoxidase may be responsible for the formation of higher oxyacids of the thiocyanate ion, such as cyanothiosulfurous and cyanothiosulfuric acids, which may also be responsible for antimicrobial inhibition. [Bjørck, L., and O. Claesson, J. Dairy Sci. 63:919-921 (1980); Hogg, et al., supra; and Pruitt, et al., Biochemistry 21:562-567 (1982)].

It is also known to provide orally-activated antimicrobial dentifrices that contain a thiocyanate/peroxidase/hydrogen peroxide system. Upon oral administration, the enzyme-dependent systems in these antimicrobial dentifrices are activated by various components (such as oxygen and/or water) of the natural chemical environment of the oral cavity. In particular, United States Letters Patent No. 4,564,519 issued to Pellico et al., (hereinafter sometimes referred to as Pellico '519) discloses a di-enzymatic chewable orally-activated antimicrobial dentifrice that includes a thiocyanate salt and lactoperoxidase which, through interaction with hydrogen peroxide formed by another enzymatic system in the dentifrice, produces a bacterial inhibitor in the form of a negative, monovalent hypothiocyanite ion (OSCN<sup>-</sup>) which exists in solution in acid-base equilibrium with hypothiocyanous acid (HOSCN).

-6-

Also, in United States Letters, Patent No. 4,576,817 issued to Montgomery et al., it was disclosed to provide antimicrobial enzymatic bandages and pads for disinfection purposes. These pads include a serum-activated oxidoreductase enzyme for producing hydrogen peroxide upon contact of the enzymatic materials with serum. In one embodiment, these antimicrobial bandages are formulated to also include a peroxidatic peroxidase, such as lactoperoxidase.

In the journal BIOFUTUR (February, 1990, at page 52), a system is disclosed having two enzymes that, in tandem, generates toxic radicals that may be useful for the treatment of various infections. This system includes glucose oxidase which, in the presence of glucose, generates  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This system also includes a peroxidase which, with the  $\text{H}_2\text{O}_2$ , generates iodides that are highly toxic for the cell. Unfortunately, the precise mechanism of this toxicity is not known. It was further reported therein that this glucose oxidase/peroxidase system has been coupled to a monoclonal antibody against Candida albicans and has been found effective for protecting against such infections in mice. This glucose oxidase/peroxidase system has also been coupled to a monoclonal antibody for the epitope of the gp 120 fraction of HIV and has been found to be effective against infections of Saccharomyces expressing this epitope.

In the journal CLINICAL RESEARCH, vol. 36, No. 5 (1988) at 809A, a lactoperoxidase-halide-hydrogen peroxide (LHHP) system was reported to be effective, in vitro, on respiratory syncytial virus (RSV) replication. It was also suggested that a myeloperoxidase-halide-peroxidase system (that plays an important role in host defense mechanisms against phagocytosed bacteria) may also have a role in host defense

-7-

against RSV.

Finally, in PCT patent application no. WO 8912457, the incorporation of myeloperoxidase with a carrier is disclosed for administration to humans for reinforcing the natural antibody activity thereof at the macrophage level. In this disclosure, purified myeloperoxidase is linked with a carrier that has an affinity for the macrophage, so that the carrier will transport the myeloperoxidase to where it may be captured and utilized by the macrophage for antibody defense. Carriers disclosed include antibodies, or fragments thereof that have an affinity for the macrophages. Other suggested carriers include particular liposomes and human serum albumin. Preferably, the myeloperoxidase and the linked carrier are formed utilizing recombinant DNA technologies. Such a composition is provided to aid, augment and reinforce the bodies natural antibody defenses and is believed to be useful in combatting various infections, including HIV.

Despite the long-standing coexistence of the knowledge of the properties of the peroxidases and the thiocyanate/peroxidase/hydrogen peroxide system, as well as the need for prophylactic and therapeutic medicaments for the prevention and treatment of infections of enveloped viruses (and in particular of herpes simplex and human immunodeficiency viruses), to the best of our knowledge no one has utilized medicaments incorporating such peroxidases or peroxide systems for the prevention or treatment of infections of enveloped viruses and, in particular, for the prevention and treatment of herpes simplex and human immunodeficiency virus infections.

Thus, it can be seen that there remains a need for prophylactic and therapeutic peroxidase medicaments which

-8-

prevent and/or treat infections of enveloped viruses, including HSV and HIV, and for prophylactic and therapeutic applications of peroxidases in a medicament that may be administered to an individual in need thereof without depending upon naturally-occurring concentrations of substrate, oxygen donors or peroxidases for their inhibitory effect. Finally, there remains a need for methods for the prevention and treatment of infections of enveloped viruses, including HSV's and HIV's, by the administration of prophylactic and therapeutic effective amounts of such peroxidase medicaments to an individual in need thereof.

Summary Of The Invention

It is a primary object of the present invention to provide uses (applications) for peroxidases in the formulation (manufacture) of medicaments for the prevention and treatment of enveloped viruses.

It is another object of the present invention to provide prophylactic and therapeutic applications of peroxidases in medicaments for the prevention and treatment of infections of enveloped viruses, including herpes simplex and human immunodeficiency viruses.

It is still another primary object of the present invention to provide prophylactic and therapeutic methods for viruses, by the administration of prophylactic and therapeutic effective amounts of peroxidase medicaments to individuals in need thereof.

As utilized herein, the term "prophylactic" refers variously to medicaments, amounts or quantities, methods,

-9-

uses and effects, etc., that prevent and/or aid in preventing infections of enveloped viruses and, in particular of the HSV's and the HIV's. As utilized herein, the term "therapeutic" refers variously to medicaments, amounts or quantities, methods, uses and effects, etc., that ameliorate infections of enveloped viruses and, in particular of the HSV's and the HIV's.

In accordance with the teachings of the present invention, there are disclosed herein prophylactic and therapeutic applications of peroxidases in medicaments, and methods for the administration of the peroxidase medicaments, for the prevention and treatment of infections of enveloped viruses, including herpes simplex and human immunodeficiency viruses.

The preferred peroxidase medicament (hereinafter sometimes referred to as the "peroxidase composition" or simply as the "composition") of the present invention, is a substantially self-contained antiviral system that may operate without depending upon naturally-occurring "in vivo" compounds, or concentrations thereof, of the user thereof. This medicament includes: an oxygen donor, which is preferably a glucose-glucose oxidase enzymatic system that generates hydrogen peroxide; a peroxidase, such as lactoperoxidase; and a substrate, chosen from a group consisting of halogens and pseudo-halogens. These peroxidase medicaments are formulated, such that comparatively short-term administration thereof is effective for the prevention and treatment of enveloped viruses, such as the HSV's and HIV's. Preferably, the concentrations and/or formulations of these various components have been chosen to maximize oxygen donor and peroxidase-generated compound production, while simultaneously maintaining the oxygen donor concentrations at

-10-

levels which do not impede with the activity of the peroxidase.

It is noted that it is preferred to formulate the peroxidase medicaments of the present invention, so as to include various components of, and mimic somewhat, the salivary thiocyanate-peroxidase system. Such a formulation is preferred since the components thereof would be genuine components of human external secretions. This formulation is further preferred since the antiviral activity thereof can possibly be further enhanced through the absorption of foods enriched with any of the various components thereof.

Accordingly, the present invention most preferably provides substantially self-contained hypothiocyanite-generating, prophylactic and therapeutic peroxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide medicaments that may be applied and utilized without depending upon the users naturally-occurring "in vivo" oral concentrations thereof, for the prevention and treatment of infections of enveloped viruses.

Other enveloped viruses to be prevented and/or treated by the peroxidase medicaments of the present invention include the paramyxoviruses (such as human parainfluenza viruses), the family of orthomyxoviruses (such as the influenza type viruses A and B), rotaviruses, coronaviruses, herpes viruses (such as Varicella-zoster virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and HHV6) and retroviruses (such as Human T-cell leukemia virus-1, bovine leukemia virus and SIV).

In still further accordance with the teachings of the present invention, there is disclosed a method for the

-11-

prevention and treatment of infections of enveloped viruses, such as herpes simplex viruses and human immunodeficiency viruses. This method involves the administration of prophylactic and therapeutic effective amounts of the peroxidase medicaments of the present invention to an individual in need thereof.

These and other objects of the present invention will become apparent from the following specification, when taken in conjunction with the enclosed figures.

Brief Description Of The Drawings

Figure 1 is a bar chart diagrammatically representing the results obtained after 20, 30 and 120 minutes of pretreatment of HSV-1 with the peroxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system of the medicaments of the present invention.

Figure 2 is a line chart diagrammatically representing the results obtained of growth of HIV-generated p24 in lymphocyte cultures in the supernatant after treatment with the peroxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system of the medicaments of the present invention.

Figure 3 is a line chart diagrammatically illustrating the results obtained of intracellular growth of p24 per  $10^6$  cells after treatment with the peroxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system of the medicaments of the present invention.

Figure 4 is a line chart diagrammatically illustrating the results of lactoperoxidase and myeloperoxidase assays.

-12-

Description Of The Invention

The peroxidase medicaments of the present invention include a peroxidase. Preferably, the peroxidase medicaments include peroxidase/oxidizable substrate/oxygen donor system that exhibits antiviral properties against enveloped viruses, including HSV's and HIV's. In these antiviral medicaments, peroxidase catalyzes oxidation of the substrate (a halogen or pseudo-halogen) by the oxygen donor (a peroxide) to form negatively-charged, monovalent oxidizing compounds. The medicaments may be formulated for prophylactic and/or therapeutic purposes, as desired and needed, for permitting the administration of prophylactic and/or therapeutic effective amounts thereof to an individual in need thereof for preventing and/or treating infections of enveloped viruses, such as the HSV's and the HIV's.

The peroxidase medicaments of the present invention are also useful for prophylactic and therapeutic applications against infections of enveloped viruses, such as paramyxoviruses, the family of orthomyxoviruses, rotaviruses, coronaviruses, herpes viruses (such as varicella-zoster virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and human herpes virus-6) and retroviruses (such as human T-cell virus-1, bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus).

The substrate of the medicaments of the present invention is chosen from a group consisting of negatively-charged halogens, and their derivatives, and negatively-charged pseudo-halogens, and their derivatives. The term "halogens" refers to certain of those elements, in their negatively-charged monovalent states, that belong to Group VII of the Periodic Table of Elements and, as is well known to those skilled in the art, includes bromide, chloride and

-13-

iodide. The term "pseudo-halogens" refers to certain negatively-charged ions and ionic compounds that are monovalent. The "pseudo-halogens" of the present invention include the thiocyanate salts, such as sodium thiocyanate, potassium thiocyanate, ammonium thiocyanate, ferric thiocyanate and mixtures thereof. These substrates and their derivatives are able to be extracted (isolated) from natural material (for example, saliva and human milk) or produced by natural or chemical methods, all of which are well known to those skilled in the art.

The peroxidases in the medicaments of the present invention catalyze the oxidation of the substrate by the oxygen donor for generating the oxidizing compounds. These peroxidases include plant (vegetable) peroxidases, such as horseradish peroxidase, and mammalian peroxidases, such as salivary peroxidases, lactoperoxidases, myeloperoxidases and eosinophil peroxidase. The peroxidases for the medicaments of the present invention may be extracted, by methods and techniques well known to those skilled in the art, from natural milieu, such as those peroxidases extracted from horseradish and saliva [for example, as described in Mansson-Rahemtulla et al., Biochemistry, 27:233-239 (1988)], as well as the lactoperoxidases extracted from milk derivatives (i.e., whey) and myeloperoxidases produced by leukocytes. These peroxidases also include those peroxidases (including myeloperoxidases) that are produced by recombinant DNA techniques, also well known to those skilled in the art.

[As utilized herein, the term "International Unit(s)" identifies that amount of the enzyme that will effect catalysis of 1 micromole of substrate per minute at pH 7 and 25°C. Enzymes are supplied in dry or liquid form with the label specifying the concentration in IU's on a per gram or per milliliter basis, as appropriate.]

-14-

Lactoperoxidase is a glycoprotein which, in one commercial embodiment is a lyophilized powder derived from milk. This commercial peroxidase has an activity of 80 International Units (hereinafter sometimes referred to as IU's) and a projected molecular weight of 93,000 for L-Tyrosine Iodination. The physical-chemical properties reported for lactoperoxidase includes: a molecular weight of 78,000; partial specific volume 0.74; and heme/mole 1.0.

Salivary peroxidase is a glycoprotein which may be derived from the saliva or the acini of the parotid glands. The chemical characteristics of salivary peroxidase are not well known. However, the physical-chemical properties reported for salivary peroxidase includes a molecular weight ranging from approximately 80,000-100,000.

Myeloperoxidase is also a glycoprotein. In one commercial embodiment (from SIGMA corp., St. Louis, Missouri, U.S.A.), myeloperoxidase may be obtained from human leukocytes, being lyophilized from 0.02 M sodium acetate buffer. This commercial embodiment has an activity of 40-100 I.U.'s.

Horseradish peroxidase is a glycoprotein. In one commercial embodiment (SIGMA, corp., St. Louis, Mo., U.S.A.), it is an essentially salt free powder. This commercial embodiment has an activity of 250-330 units per mg. solid. Preliminary studies of this embodiment have indicated the presence of two basic and no acidic isoenzymes therein. [As utilized herein, the term "unit" refers to that amount of the horseradish peroxidase that will form 1.0 mg purpurogallin in 20 sec. at pH 6.0 at 20°C. This purpurogallin (20 sec.) unit is equivalent to approx. 18 uM units per min. at 25°C.]

-15-

Examples of the preferred peroxidase/substrate combinations to utilize in the medicament of the present invention are set forth below in Table IA:

TABLE IA

<u>Peroxidase</u>	<u>Substrates</u>
(1) Salivary peroxidase	thiocyanate, iodide
(2) Lactoperoxidase	thiocyanate, iodide
(3) Myeloperoxidase	chloride, iodide, thiocyanate
(4) Horseradish peroxidase	chloride, iodide
(5) Plant peroxidase	chloride, iodide, bromide

The reactions of representative enzyme systems from Table IA (in the presence of a peroxide -which for purposes of illustration herein, will be hydrogen peroxide- from the oxygen donor) to produce either a hypohalite or hypo-thiocyanite compound, are set forth in Table IB, as follows:

TABLE IB

- (1a) Salivary peroxidase catalyzes the interaction of thiocyanate and hydrogen peroxide to produce hypothiocyanite and water;
- (1b) Salivary peroxidase catalyzes the interaction of iodide and hydrogen peroxide to produce hypoiodite and water;
- (2a) Lactoperoxidase catalyzes the interaction of thiocyanate and hydrogen peroxide to produce hypothiocyanite and water;
- (2b) Lactoperoxidase catalyzes the interaction of iodide and hydrogen peroxide to produce hypoiodite and water;
- (3a) Myeloperoxidase catalyzes the interaction of chloride and hydrogen peroxide to produce hypochlorite and water;
- (3b) Myeloperoxidase catalyzes the interaction of iodide and hydrogen peroxide to produce hypoiodite and water;
- (3c) Myeloperoxidase catalyzes the interaction of thiocyanate and hydrogen peroxide to produce hypothiocyanite and water;
- (4a) Horseradish peroxidase catalyzes the interaction of chloride and hydrogen peroxide to produce hypochlorite and water;

-16-

Table IB continued

- (4b) Horseradish peroxidase catalyzes the interaction of iodide and hydrogen peroxide to produce hypoiodite and water; (5a) Plant peroxidases catalyze the interaction of chloride and hydrogen peroxide to produce hypochlorite and water; (5b) Plant peroxidases catalyze the interaction of iodide and hydrogen peroxide to produce hypoiodite and water; and (5c) Plant peroxidases catalyze the interaction of bromide and hydrogen peroxide to produce hypobromite and water.

The oxygen donor of the present invention provides (supplies) the peroxide (for example, hydrogen peroxide) in the medicament necessary for oxidation of the substrate.

Preferably, the oxygen donor is an enzymatic system including a substrate, an enzyme specific to such substrate and other necessary reactants, such as water and/or oxygen and/or hydrogen. Alternatively, microorganisms, such as the Steptococci and Lactobacilli that are commonly referred to as lactic acid bacteria may be utilized in the medicaments of the present invention to supply the peroxide (in the form of hydrogen peroxide). Specific examples of such lactic acid bacteria include Lactobacillus casei and Streptococcus faecalis and Streptococcus mutans. Use of such microorganisms (microbes) is especially preferred in the medicaments formulated for use as a vaginal cream for topical application.

It is also contemplated herein that inorganic peroxides (such as sodium peroxide and magnesium peroxide) or organic peroxides (such as benzyl peroxide and urea peroxide) may be utilized. Also, chemicals that, upon reaction, produce hydrogen peroxide may be utilized. Indeed, even hydrogen peroxide itself may be utilized as the oxygen donor. The precise oxygen donor to be utilized will vary depending upon several factors, including the formulation into which the medicament is to be made for administration.

-17-

Most preferably, the oxygen donor is an enzymatic system including an oxidizable substrate, an oxidoreductase enzyme specific to such substrate and other necessary reactants, such as oxygen and/or water. Examples of such oxidizable substrates, and oxidoreductase enzymes specific therefor, include those enumerated in United States Patent No. 4,564,519 issued to Pellico et al. (hereinafter referred to as Pellico '519). Such examples are set forth below in Table IIIA:

TABLE IIIA

Oxidizable Substrate	Oxidoreductase Enzyme	Other Reactants
(a) D-D-glucose	glucose oxidase	Water, Oxygen
(b) D-galactose	galactose oxidase	Oxygen
(c) urate	urate oxidase	Water, Oxygen
(d) choline	choline oxidase	Oxygen
(e) D-amino acids*	D-amino acid oxidase	Water, Oxygen
(f) D-glutamate	D-glutamate oxidase	Water, Oxygen
(g) glycine	glycine oxidase	Water, Oxygen
(h) glycollate	glycollate oxidase	Water, Oxygen
(i) L-sorbose	L-sorbose oxidase	Water, Oxygen
(j) primary alcohol	alcohol oxidase	
(k) primary amine	amine oxidase	
(l) NAD(P)H	NAD(P)H oxidase	

\* D-amino acids includes D isomers of proline, methionine, isoleucine, alanine, valine and phenylalanine.

The reactions of representative enzyme systems from Table IIIA to produce hydrogen peroxide are set forth in Table IIB.

TABLE IIB

- (a) Glucose oxidase catalyzes the interaction of Beta-D-glucose, water and oxygen to produce hydrogen peroxide and gluconic acid;
- (b) Galactose oxidase catalyzes the interaction of D-

-18-

TABLE IIB continued

- galactose and oxygen to produce hydrogen peroxide and D-galacto-hexo-dialdose;
- (c) Urate oxidase catalyzes the interaction of urate, water and oxygen to produce hydrogen peroxide, allantoin and carbon dioxide;
- (d) Choline oxidase catalyzes the interaction of choline and oxygen to produce hydrogen peroxide and betaine aldehyde;
- (e) D-amino acid oxidase catalyzes the interaction of D-amino acids, such as the D-isomers of proline, methionine, isoleucine, alanine, valine and phenylalanine together with water and oxygen to produce hydrogen peroxide, ammonia and the corresponding alpha-keto acids;
- (f) D-glutamate oxidase catalyzes the interaction of D-glutamate, water and oxygen to produce hydrogen peroxide, ammonia and 2-oxoglutarate; and
- (g) Glycine oxidase catalyzes the interaction of glycine, water and oxygen to produce hydrogen peroxide, ammonia and glyoxylic acid.

The characteristics of representative oxidoreductase enzymes identified in Table IIIA, from specific sources, are recited in Pellico '519, which recitations relating to these characteristics are hereby incorporated herein as part hereof.

Most preferably, the peroxidase medicaments of the present invention include either lactoperoxidase or myeloperoxidase in combination with a thiocyanate (SCN-) substrate and of a glucose/glucose oxidase enzymatic system oxygen donor.

It is preferred that the above-mentioned peroxidase/substrate/peroxide systems be formulated into the prophylactic and therapeutic medicaments for "in vivo" use as a substantially self-contained system that may be applied or used substantially without depending upon the users naturally-occurring "in vivo" concentrations of substrate, oxygen donors, peroxidases or other ingredients.

-19-

It is noted that the effectiveness of the peroxidase medicaments of the present invention may be effected by the naturally-occurring environment in which the medicament is to be administered. For example, in the human mouth, the concentration of hydrogen peroxide varies as a direct function of biological production and salivary flow. When salivary flow is at a diminished level, either as a natural event or as an event arising out of certain types of medical treatment, the oral concentrations of various elements, such as potassium thiocyanate and peroxidase, will be correspondingly reduced. This, in turn, may be a limiting factor in the prophylactic or therapeutic effectiveness of the medicament when it is orally administered. Moreover, when the oral concentration of peroxidase is suppressed through diminished salivary flow, oral concentrations of hydrogen peroxide may increase to a threshold level, wherein the hydrogen peroxide can impede the effectiveness of peroxidase of the medicament.

Accordingly, it can be seen that the concentrations of the substrate, oxygen donor and peroxidase in the medicaments described above should be adjusted and controlled to harmonize hydrogen peroxide and peroxidase concentrations, so as to limit the hydrogen peroxide concentrations to levels which do not impede with the activity of the peroxidase.

[As utilized herein, the term millimole identifies that quantity in grams corresponding to the molecular weight of the medicament divided by one thousand.]

When the oxygen donor is hydrogen peroxide itself, it is generally present in the medicament of the present invention in an amount from about 2 to about 300 millimole per gram or per milliliter of medicament and, preferably, from about 3 to

-20-

about 30 millimole per gram or per milliliter of medicament.

In the event the oxygen donor is an oxidizable substrate and an oxidoreductase enzyme specific to the substrate, then the oxidizable substrate is generally present in the peroxidase medicament in an amount from about 0.015 to about 0.6 millimole per gram or per milliliter of medicament and, preferably, from about 0.025 to about 0.1 millimole per gram or per milliliter of medicament while the oxidoreductase is generally present in the medicament in an amount from about 0.5 to about 500 IU's per gram or per milliliter of the medicament and, preferably, from about 1.0 to about 40 IU per gram or per milliliter of the medicament.

In the event the oxygen donor is an organic or inorganic peroxide, then such peroxide is generally present in the medicament in an amount from about 0.000006 to about 0.6 millimole per gram or per milliliter of medicament and, preferably, from about 0.00006 to about 0.06 millimole per gram or per milliliter of medicament.

The substrate is generally present in the medicament in an amount ranging from about 0.000008 to about 0.01 millimole per gram or per milliliter of medicament and, preferably, from about 0.000008 to about 0.006 millimole per gram or per milliliter of medicament.

In the event that the substrate is a thiocyanate salt (a pseudo-halogen), then it is generally present in the medicament in an amount from about 0.0001 to about 0.01 millimole per gram or per milliliter of medicament and, preferably, from about 0.001 to about 0.006 millimole per gram or per milliliter of medicament. Care should be taken in formulating the medicament, so as to avoid the use of

-21-

metal compounds which inhibit or impair the effectiveness of the enzymes.

In the event that the substrate is a halogen, then it is generally present in the medicament in an amount from about 0.0000008 to about 0.008 millimole per gram or milliliter of medicament and, preferably, from about 0.000008 to about 0.004 millimole per gram or per milliliter of medicament.

The peroxidase is generally present in the medicaments in an amount from about 0.01 to about 50 IU per gram or per milliliter of medicament and, preferably, in an amount from about 0.2 to about 4.0 IU per gram or per milliliter of medicament.

It is noted that, if desired, the peroxidase medicament may be formulated for "in vivo" use as a system that relies upon certain naturally-occurring "in vivo" concentrations of any one or combination of compounds of the system for obtaining the peroxidase-generated antiviral compound.

The antiviral prophylactic and therapeutic qualities of the peroxidase medicaments of the present invention may be dependent on the concentration of compounds that are produced by the formulation of the medicament of the present invention. The produced concentrations of these compounds may vary between 1 micro molar and 100 millimolar, with concentrations of between 5 micro molar and 1 millimolar being preferred. For achieving this, the concentration of peroxidase units relative to the concentrations of the oxygen donor and/or of the substrate is able to be varied over a large range.

-22-

The presence of water promotes the oxidation/reduction reactions of the peroxidase medicaments of this invention. It also is a reactant in certain reactions. Thus, preferably, the use of water in formulating the said medicaments should be at a relatively low concentration levels in order to impart maximum stability and shelf life thereto.

Where the products of the activated enzyme systems in the medicaments include a weak organic acid, it is advantageous to formulate the medicament with a buffering agent to neutralize the organic acid. A suitable buffering agent is sodium bicarbonate.

In this regard, it is preferred that the peroxidase medicaments of the present invention should be formulated, so as to have a pH that substantially approximates physiological pH. In particular, it is preferred that the medicaments of the present invention have a pH ranging from 4.5 to 6.5, with a pH of from 6 to 6.5 being especially preferred.

It is to be understood that to be formulated as a self-contained active medicament, the ingredients of the medicament must be disposed together in the formulation with at least some of the ingredients thereof being maintained chemically-separated from one another until the use thereof. For example, the peroxidase, oxygen donors (the oxygen donor enzymatic systems or the microorganisms) may be immobilized or microencapsulated, so that until the use thereof, they will not react with one another. If none of the substances of the systems described above are destroyed or inhibited by any ingredients, the medicament will have activity against enveloped viruses, including herpes simplex viruses and HIV's.

The peroxidase medicaments of the present invention may

-23-

be formulated with a pharmaceutically-acceptable carrier in any suitable manner desired for administration in the particular situation. For example, the medicaments may be formulated as a dentifrice (such as a chewing gum, mouthwash, toothpaste, spray, lozenge or edible bonbon) for oral administration in the treatment of mouth infections. Alternatively, the medicaments may be formulated in a topical formulation (such as a spray, gel, cream, eye drops, shampoo, etc.) and/or incorporated in a bandage or a pad for topical administration to the skin, eyes, hair, etc., of individuals in need thereof. Finally, the medicaments may also be formulated as an injectable solution for internal application.

Formulations, equipment and processing techniques have been well developed and are well known in the art for preparing and packaging the medicaments of the present invention as either topical, oral or injectable formulations. The peroxidase/substrate/peroxide systems in the medicaments of this invention are adapted to be incorporated into these formulations. However, the enzymes described herein are subject to degradation and inactivation under conditions such as high shear and elevated temperatures. Accordingly, processing conditions should be controlled during the time span that the enzymes are being admixed with the other ingredients of the formulation of the medicaments and converted into finished products, so that the temperature does not rise above 55°C. for any extended period of time.

In order to enhance shelf stability, the admixture used in the preparation of the formulations of the peroxidase medicaments of the present invention should be substantially free of unbound water and the finished product should be packaged in a manner, so as to minimize exposure to air and moisture.

-24-

The peroxidase medicaments of the present invention will better understood by reference to the following examples, which are illustrative only and are not meant to be limiting in any manner:

#### EXAMPLE I

Illustrative base formulations for pharmaceutically-acceptable carriers for the peroxidase medicaments to be formulated with as a dentifrice for oral administration, such as a chewing gum and chewable tablets and lozenges are set forth in Table III, as follows:

TABLE III

Ingredients	Weight, Percent			
	(a)	(b)	(c)	(d)
Sorbitol, crystalline	75	--	98	28
Corn sugar	--	75	--	70
Gum base	23	23	--	--
Flavor	1	1	1	1
Color	0.5	0.5	0.5	0.5
Buffer	--	--	0.5	0.5
Saccharin, sodium	0.005	--	0.005	--

In Table III, formulations (a) and (b) illustrate pharmaceutically-acceptable carriers in the form of chewing gum compositions while formulations (c) and (d) illustrate pharmaceutically-acceptable carriers in the form of tablet and lozenge compositions. Aspartame can be substituted for sodium saccharin in these formulations.

The following examples show varying ingredients and

-25-

concentration levels which can be used in the preparation of dentifrices for providing the prophylactic and therapeutic effective amounts for oral administration according to the present invention:

TABLE IV

	Weight, grams		
	4A	4B	4C
<u><b>Chewing Gum</b></u>			
Sorbitol, Crystalline	70	70	70
Gum base	23	23	23
Glycerol	5	5	5
Flavor	1	1	1
Color	0.5	0.5	0.5
Sodium Bicarbonate	0.5	0.5	0.5
	100.0	100.0	100.0
<u><b>Peroxidase/Substrate/Peroxide System (per 100g. chewing gum)</b></u>			
Glucose oxidase	40,000 IU	--	--
B-D glucose	1.0 g	--	--
Choline oxidase	--	8,000 IU	--
Choline	--	1.0 g	--
D-glutamate oxidase	--	--	2,500 IU
D-glutamate	--	--	0.1 g
Lactoperoxidase	4,000 IU	1,500 IU	1,000 IU
Potassium thiocyanate	0.01 g	0.005 g	--
Sodium thiocyanate	--	--	0.01 g

TABLE V

	Weight, grams		
	5A	5B	5C
<u><b>Chewing Gum</b></u>			
Sorbitol, Cryst.	43	43	43
Gum Base	20	20	20
Glycerol	25	25	25
Flavor	1	1	1
Color	0.5	0.5	0.5
Sodium Bicarbonate	0.5	0.5	0.5
	100.0	100.0	100.0

-26-

TABLE V continued

<u>Peroxidase/Substrate/Peroxide System (per 100 g chewing gum)</u>				
D-Amino acid oxidase	5,000 IU	—	—	—
D-Alanine	0.1 g	—	—	—
Glucose oxidase	—	20,000 IU	2,000 IU	—
B-D-Glucose	—	0.5 g	0.5 g	—
Lactoperoxidase	500 IU	2,500 IU	1,000 IU	—
Potassium thiocyanate	—	0.01 g	0.005 g	—
Sodium thiocyanate	0.01 g	—	—	—
Sodium ascorbate	—	0.01 g	—	—

TABLE VI

	Weight, grams		
	6A	6B	6C
<u>Lozenge</u>			
Sorbitol, Crystalline	97	97	97
Glycerol	1	1	1
Flavor	1	1	1
Color	0.5	0.5	0.5
Sodium Bicarbonate	0.5	0.5	0.5
	100.0	100.0	100.0

Peroxidase/Substrate/Peroxide System  
(per 100g. lozenge)

Glucose oxidase	10,000 IU	—	—
B-D glucose	1.0 g	—	—
Choline oxidase	—	—	2,000 IU
Choline	—	—	0.5 g
Urate oxidase	—	10,000 IU	—
Urate	—	0.75 g	—
Lactoperoxidase	200 IU	200 IU	1,500 IU
Potassium thiocyanate	—	—	0.01 g
Sodium thiocyanate	0.05 g	0.08 g	—

-27-

TABLE VII

	Weight, grams		
	7A	7B	7C
<u>Lozenge</u>			
Sorbitol, Crystalline	80	80	80
Corn sugar	17	17	17
Flavor	1	1	1
Color	0.5	0.5	0.5
Sodium Bicarbonate	0.5	0.5	0.5
	100.0	100.0	100.0
<u>Peroxidase/Substrate/Peroxide System (per 100g. lozenge)</u>			
Glucose oxidase	--	5,000 IU	1,000 IU
B-D glucose	--	0.5 g	1 g
D-glutamate oxidase	10,000 IU	--	--
D-glutamate	0.05 g	--	--
Lactoperoxidase	1,500 IU	2,000 IU	1,000 IU
Potassium thiocyanate	0.001 g	0.005 g	--
Sodium thiocyanate	--	--	0.005 g

## EXAMPLE II

Illustrative base formulations for pharmaceutically-acceptable carriers for the peroxidase medicaments of the present invention to be formulated as a topical medicament for topical administration, such as a cream, a gel or to be incorporated in a bandage or pad, are set forth in Table VIII, as follows:

-28-

TABLE VIII

Ingredients	Weight, Percent	
	(a)	(b)
Deionized water	19.02	20.0
Corn Starch*	38.04	---
Lubrajel DV*	38.04	---
Aloe vera	0.000021	---
Natrosol 250 M*	0.1	---
Xylitol	4.76	---
Cirami N.1*	---	20.0
Sunflower Oil	---	40.0
Vitamin E	---	0.05
Tensami 4/07*	---	2.0
Tensami 1/05*	---	3.0
Bronopol*	---	2.0
Myacide SP*	---	2.0
Propylene Glycol	---	10.0

\* An example of such a corn starch is the hydrogenated starch solution marketed under the name HYSTAR TPF by Alban Muller International, Montreuil, France.

\* Lubrajel DV is a Glycerine and acrylic solution marketed by Alban Muller International, Montreuil, France.

\* Natrosol 250 M is a hydroxyethylcellulose marketed by Aqualon, Inc., of Hopewell, Virginia, U.S.A.

\* Cirami N.1, Tensami 4/07, Tensami 1/05, Bronopol and Myacide SP are all marketed by Alban Muller International, Montreuil, France.

In Table VIII, formulation (a) illustrates pharmaceutically-acceptable carriers in the form of a gel, and (b) illustrates pharmaceutically-acceptable carriers in the form of a cream.

The following Tables show varying ingredients and prophylactic and therapeutic effective amounts (quantities) which can be used in the preparation of topical peroxidase medicaments, according to the present invention:

-29-

TABLE IX

<u>Ingredients</u>	<u>Weight, grams</u>	
	<u>9A</u>	<u>9B</u>
<u>Gel</u>		
Deionized water	19.03	19.03
Corn Starch	38.054	38.054
Lubrajel DV	38.054	38.054
Aloe vera	0.001	0.001
Natrosol 250 M	0.1	0.1
Xylitol	4.76	4.76
	100.00	100.00
<u>Peroxidase/Substrate/Peroxide System (per 100 g Gel)</u>		
Glucose oxidase	10,000 IU	--
B-D Glucose	1.0 g	--
Choline oxidase	--	8,000 IU
Choline	--	1.0 g
Lacteroperoxidase	200 IU	1,500 IU
Potassium thiocyanate	--	0.005 g
Sodium thiocyanate	0.05 g	--

TABLE X

<u>Ingredients</u>	<u>Weight, grams</u>		
	<u>10A</u>	<u>10B</u>	<u>10C</u>
<u>Cream</u>			
Deionized Water	21.51	21.51	21.51
Cirami N.	20.0	20.0	20.0
Sunflower Oil	40.0	40.0	40.0
Vitamin E	0.04	0.04	0.04
Tensami 4/07	2.0	2.0	2.0
Tensami 1/05	3.0	3.0	3.0
Bronopol	2.0	2.0	2.0
Myacide SP	2.0	2.0	2.0
Propylene Glycol	10.0	10.0	10.0
	100.00	100.00	100.00
<u>Peroxidase/Substrate/Peroxide System (per 100 g Cream)</u>			
Glucose oxidase	5,000 IU	--	--
B-D glucose	0.5 g	--	--
D-Amino acid oxidase	--	5,000 IU	--

-30-

TABLE X continued

D-Alanine	---	0.1 g	---
Urate oxidase	---	---	10,000 IU
Urate	---	---	0.75 g
Lactoperoxidase	2,000	500 IU	200 IU
Potassium thiocyanate	0.005 g	---	---
Sodium thiocyanate	---	0.01 g	0.08 g

## EXAMPLE III

Illustrative formulations for pharmaceutically-acceptable carriers for the peroxidase medicaments of the present invention to be formulated as an eye wash solution for topical administration as an eye drop or an eye wash, are set forth in Table XI, as follows:

TABLE XI

Ingredients	Weight, Percent	
	(a)	(b)
Sorbic Acid 0.0025%	---	0.0002
Purified Water	99.4	98.1
Boric acid	0.018	0.0176
Sodium Borate (Hydrated 10 H <sub>2</sub> O)	0.0015	0.0013
Sodium chloride	0.0025	---
Benzalkonium chloride <sup>1</sup>	0.0001	---
Edetate disodium <sup>2</sup>	0.001	---

<sup>1</sup> Benzalkonium chloride and Edetate disodium are added as preservatives.

The following Table shows the varying ingredients and the prophylactic and therapeutic effective amounts (quantities) which can be used in the preparation of eye wash medicaments, according to the present invention:

-31-

TABLE XII

Ingredient	Amounts per 5 ml Eye Wash <sup>1</sup>
Glucose oxidase	2,500 units <sup>2</sup>
Glucose	20 milligrams
Lactoperoxidase	150,000 ABTS units <sup>3</sup>
Potassium thiocyanate	200 micrograms

<sup>1</sup> The eye wash solution is a 5 ml solution of: 90 milligrams of Boric acid; 6.6 milligrams of hydrated sodium borate (10 H<sub>2</sub>O); 2500 units Vitamin A and 0.125 ug of sorbic acid 0.0025%.

<sup>2</sup> As utilized in this example, the term "unit" of Glucose oxidase identifies that amount of Glucose oxidase that oxidizes 3.0 milligram glucose to gluconic acid in one minute at pH 5.10 and 37°C. The assay conditions are set forth in Assay method FS 250 of Finnish Sugar Co. Ltd., of Finland. In this Example, 1 milligram of glucose oxidase has an activity of 100-120 units at 37°C at pH 5.

<sup>3</sup> As utilized herein, the term "ABTS units" identifies that amount of lactoperoxidase that catalyzes the oxidation of 1mM of the ABTS substrate [2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)] in one minute at pH 5 and 37°C. The assay conditions are set forth by Mansson-Rahemtulla, B., et al., Biochemistry, Vol. 27, at pages 233-239 (1988). In this Example, 1 milligram of lactoperoxidase has an activity of 600 ABTS units at 37°C and 5 pH.

The composition is formulated separately in two parts, which, before application, are combined and shaken to dissolve and mix the two parts.

The first part is a mixture of the lactoperoxidase and the glucose oxidase. The second part is a 5 ml solution of the boric acid, hydrated sodium borate (10 H<sub>2</sub>O), vitamin A, 0.0025% sorbic acid, potassium thiocyanate, water and glucose. The 5 ml solution (the second part) is mixed with the first part and shaken to dissolve the powder. Administration may be made as normal eye drops.

-32-

#### EXAMPLE IV

An illustrative base formulation for a pharmaceutically-acceptable carrier for the peroxidase medicaments to be formulated as an injectable composition (solution) for internal (injectable) administration. The base composition is a buffer solution (pH 7) of 0.15 molar sodium chloride and 60 millimolar sodium phosphate. To this composition 30 units of myeloperoxidase is added and the solution is mixed to form the medicament. [As utilized in this Example, a unit refers to that quantity of the enzyme necessary for catalyzing the increase of 1 unit of absorbance at 470 nm in one minute at room temperature using auto-dianisidine, see Krawicz, et al., Gastroenterology, vol. 87, pps. 1344-1350 (1984). In this context, 1 microgram equals 1 unit].

A prophylactic or therapeutic effective amount (for example, approximately 0.5 ml) of this medicament is then administered to a patient in need thereof. Preferably, this administration will be by intramuscular injection.

It is noted that this same solution may be used as a spray when nebulized as normally authorized.

#### EXAMPLE V

This example shows the effectiveness of the peroxidase/substrate/peroxide system of the peroxidase medicaments of the present invention against an enveloped virus and, in particular, against herpes simplex virus-1. The peroxidase/substrate/peroxide system of the peroxidase medicaments was prepared having the formulation set forward in Table XIII below:

-33-

TABLE XIII

<u>Ingredient</u>	<u>Amounts per 100 ml buffer solution<sup>1</sup></u>
Glucose oxidase	0.02 milligrams
Glucose	1.20 millimoles
SCN <sup>-</sup>	0.06 millimoles
Lactoperoxidase	4.00 milligrams

<sup>1</sup> The buffer solution is a Hank's-Balanced Salt Solution that is calcium, magnesium and glucose free. The pH of the buffer solution is 7.4. The weights of the contents of the HBSS buffer solution is as follows, for every 1000 ml of distilled water: 8 grams NaCl; 0.4 grams KCl; 0.06 grams Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; and 0.06 grams of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Four (4) strains of HSV-1 viruses were collected from exsudates of herpetic lesions on tongue, nasopharyngeal cavity and vulva. These samples were pooled then typed as HSV-1 using immunofluorescence. They were subsequently allowed to multiply in MRCS cells and growth medium. Separation from cells and cell debris was performed by centrifugation. Viruses were then stocked in aliquots in liquid nitrogen.

Samples from the HSV-1 pool were then diluted from ten to ten fold down to the antepenultimate cytotoxic titre which was taken as base line for each experiment or control.

The peroxidase formulation set forth above in Table XV was then mixed with an equal volume of the HSV-1 pool suspension at the base line titre (1ml/1ml).

These virus and the peroxidase formulation mixtures were allowed 30, 60 or 120 minutes incubation at 37°C. They were

-34-

then diluted from 10 to 10 fold to obtain suspensions at 5 exponentially decreasing concentrations. Of each of these suspensions, 50 microliters were sampled to inoculate a layer of fibroblasts grown "in vitro".

After inoculation, the cell cultures were examined daily up to seven days. Marks of cytotoxicity were semiquantitatively quoted, as follows: 1+ being from 0 to 25%; 2+ being from 25 to 50%; 3+ being from 50 to 75%; 4+ being from 75 to 100%.

Controls were settled by substituting the oxidizing moiety with an equal volume of the HBSS buffer. On the contrary, blanks held the complete oxidative system of the formulations but the virus moiety was replaced by the growth medium.

The cytotoxicity of pretreated virus was compared with that of suspensions which had not been in contact with the peroxidase formulation. This comparison allowed to express the results in terms of:

1. no effect: that is, no difference of cytotoxicity between experiments and controls;
2. delaying effect: when a minimum 24 hour delay lengthened the lag phase before the onset of cytotoxicity;
3. inhibiting effect: when a complete inhibition of the virus cytotoxicity was noticed.

Twenty samples of the HSV-1 pool, were dispersed each into five (5) consecutive dilutions (from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$ ) which were treated by mixing in the peroxidase formulations. These tests were compared with the equivalent number of controls which yield the results plotted in Figure 1.

-35-

As can be seen by reference to Figure 1, a one hundred and twenty (120) minute incubation period in the presence of the peroxidase formulation induced complete inhibition of HSV-1 cytotoxic potential. Sixty (60) and thirty (30) minutes of incubation yield 2/3 and 1/3 of complete inhibition, 1/3 and 1/6 delaying effect, respectively. However, 1/2 of the samples which had sustained thirty (30) minutes incubation with the oxidase formulation, showed no loss of cytotoxicity.

A direct toxicity on the fibroblast layers, due to the oxidative moiety, could not be avoided in few cases, when assaying the highest concentration (H) of the mixtures. This toxicity, however, was no more found while using the ensuing dilutions (that is from  $H \times 10^{-1}$ ), so that it never disturbed the reading of viral toxicity itself.

The results nonetheless disclose an obvious weakening of the viruses cytotoxicity power. They appear to be time dependent.

#### Example VI

This example shows the effectiveness of the peroxidase/substrate/peroxide system of the peroxidase medicaments of the present invention against an enveloped virus and, in particular, against human immunodeficiency virus. The peroxidase/substrate/peroxide system of the peroxidase medicaments was prepared having the formulation set forward in Table XIV below:

-36-

TABLE XIV

Ingredient	Amounts per 100 ml buffer solution <sup>1</sup>
Glucose oxidase	0.02 milligrams
Glucose	1.20 millimoles
SCN <sup>-</sup>	0.06 millimoles
Lactoperoxidase	4.00 milligrams

<sup>1</sup> The buffer solution is a Hank's-Balanced Salt Solution that is calcium, magnesium and glucose free. The pH of the buffer solution is 7.4. The weights of the contents of the HBSS buffer solution is as follows, for every 1000 ml of distilled water: 8 grams NaCl; 0.4 grams KCl; 0.06 grams Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; and 0.06 grams of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

HIV aliquots were obtained from a supernatant of ARV-4 cell line. The aliquots were then extemporaneously mingled with an equal volume of the peroxidase formulation set forth in Table XIV and incubated from 1 hour down to 2 minutes at 37°C.

HIV plus the peroxidase formulation was then inoculated to phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocyte cultures. Final dilution of the aliquots was 1:20, 1:100 and 1:200. Controls were obtained by preincubating the virus in the buffer alone. The cultures were supplied again with fresh lymphocytes on day 11 (arrows in figure 2). Virus growth was monitored with an ELISA detecting p24 either intra-cellular (per 10<sup>6</sup> cells) or in the supernatant.

In control experiments experiments, the virus produced early intracellular p24 when inoculated to human lymphocytes, at final dilutions 1:20 and 1:100. Dilution 1:200 however yielded both delayed and lower amounts of p24. By contrast,

-37-

virus treated with the peroxidase formulation only produced low amounts of p24 at dilution 1:20. The results of these experiments are summarized and can be seen with reference to Figures 2 and 3.

Fifteen (15) days lymphocyte culture yielded 90 pg of p24 per  $10^6$  in controls inoculated with 1:200 diluted virus, while 25 pg only were detected after inoculation of virus treated within the peroxidase formulation for one (1) hour and diluted 1:20. With higher dilutions, no p24 was detected in  $10^6$  cells. But the whole culture of  $10^7$  cells had nevertheless been contaminated by infectious particles since p24 had been shed later on into the supernatant.

Cytopathic effect brought forth by the virus in control experiments was not observed after treatment of lymphocytes with the peroxide formulation alone. By contrast, leaving SCN<sup>-</sup> out the mixture (and therefor allowing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation), proved to be cytotoxic at the lowest dilution (1:20).

Kinetic experiments were preformed with preincubation at 2, 10, 20, 30 and 60 minutes. These showed that 2 minutes contact with the undiluted peroxidase formulation was enough to reduce the HIV infectivity exhibited in the samples.

#### Example VII

This example also shows the effectiveness of the peroxidase/substrate/peroxide system of the peroxidase medicaments of the present invention against an enveloped virus and, in particular, against human immunodeficiency virus. The peroxidase utilized in this example is purified

-38-

human recombinant myeloperoxidase.

An MPO-MIX was prepared. This MPO-MIX included 500 ul of culture medium (RPMI, Gibco and 5% fetal calf serum, Seralab), supplemented with sodium thiocyanate (20 ug/ml), glucose 1%, glucose oxidase (6 mU/ml) and from 10 to 40 ug/ml of purified human recombinant myeloperoxidase. This human recombinant myeloperoxidase was produced utilizing the method described in patent application no. PCT/EP89/00668. However, it is to be understood that this myeloperoxidase may be obtained from any suitable source.

A 60 ul viral suspension of HTLVIIIB virus, derived from infected Molt3 cells, i.e., 1200 TCID<sub>50</sub> (Tcells infectious dose 50%) is prepared.

Finally, 2.10<sup>6</sup> reporter Sup T1 cells are obtained. In particular, supT1 cells, derived from a human lymphoma (J. Hoaxie, Univ. of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.) were utilized.

The standard procedure was performed as follows:

The HTLVIIIB viral suspension (60 ul) was added to the MPO-MIX (500 ul) and the resulting mixture was incubated for 15 minutes at 37°C. The mixture was then transferred onto a Sup T1 cell pellet (containing 2.10<sup>6</sup> cells) and further incubated for 30 minutes at 37°C with gentle stirring. Cells were then washed twice with culture medium RPMI and fetal calf serum), pelleted and resuspended in 10 ml of the same culture medium, i.e., at a cell density of 2.10<sup>6</sup> cells/ml. These resuspended cells were then cultivated at 37°C for ten (10) days.

-39-

Microscopic examination (monitoring) of the cultures was done at days 3, 5 and 7 to record cytopathic effects, such as the formation of syncitia. On day 10, 450 ul of the cell culture was collected. This 450 ul of the cell culture was then mixed with 50 ul of buffered saline containing 10% Triton X-100 and stored at -20°C before use. The samples were subsequently analyzed by ELISA to quantify the p24 HTLVIIIB antigen (the viral progeny). More precisely, the chosen ELISA measures the amount of HTLVIIIB p24 protein and uses as primary antibody a murine monoclonal antibody raised against p24 (Dupont, U.S.A.) and, as secondary antibody, human anti HTLVIIIB immunoglobulins labelled with biotin. Specific complexes were revealed using a streptavidin-horse radish peroxidase conjugate (Amersham) and the OPDA chromogenic substrate (Sigma). Optical densities were read at 490 nm.

The results of these experiments are set forth below in Table XV. These results show that the peroxidase medicament of the present invention containing human recombinant myeloperoxidase at concentrations ranging from 10 to 40 ug/ml, completely inhibits the replication of the HTLVIIIB virus.

TABLE XV

Test		Days of Culture Following exposure of virus to rMPO				
		0	3	5	7	10
1. Virus HTLVIIIB						
	+ MPO-MIX (10 ug/ml MPO)	CPE <sup>a</sup> ELISA=	nd nd	-- 15	-- 18	-- 19 nd 13

-40-

TABLE XV continued

<b>2. Virus HTLVIIIB</b>							
+ MPO-MIX (20 ug/ml MPO)	CPE <sup>1</sup> ELISA <sup>2</sup>	nd nd	-- 26	-- 23	-- 18	-- nd	19
<b>3. Virus HTLVIIIB</b>							
+ MPO-MIX (40 ug/ml MPO)	CPE <sup>1</sup> ELISA <sup>2</sup>	nd nd	-- 20	-- 14	-- 17	-- nd	13
<b>4. Virus HTLVIIIB alone</b>	CPE <sup>1</sup> ELISA <sup>2</sup>	nd nd	(+) 73	+	++ 170	nd 354	1000
<b>5. SupTi cells</b>							
+ MPO-MIX (40 ug/ml MPO) (no HTLVIIIB)	CPE <sup>1</sup> ELISA <sup>2</sup>	nd nd	-- 18	-- 23	-- 19	-- nd	16
<b>6. Virus HTLVIIIB</b>							
+ MPO-MIX (40 ug/ml MPO) (no Glucose Oxidase)	CPE <sup>1</sup> ELISA <sup>2</sup>	nd nd	(+) 87	+	++ 115	nd 193	835
<b>7. Virus HTLVIIIB</b>							
+ MPO-MIX (no MPO)	CPE <sup>1</sup> ELISA <sup>2</sup>	nd nd	(+) 115	+	++ 394	nd 658	800

<sup>1</sup> CPE (Cytopathic effects):

- means no syncitia was observed.

± means a few small syncitia was observed.

+ -&gt; ++ means an increase in the number and size of syncitia was observed.

<sup>2</sup> ELISA: are expressed in milli units OD<sub>490</sub>

As can be from Table XV, in samples 1, 2 and 3 no syncitia was observed and inhibition of viral replication was noted. Sample 4 exhibited positive control: both syncitia and viral replication were observed. Sample 5 exhibited negative control: no virus in the assay. In Sample 6 the MPO enzyme lacked one of its substrates (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Thus, no effect

-41-

on viral replication was noted. Finally, in sample 7, since there was no MPO in the assay, no effect on viral replication was observed.

The sum total of the above assays is to demonstrate that use of myeloperoxidase, in appropriate concentrations, in the peroxidase system of the medicament of the present invention completely inhibits the replication of HTLVIIIB virus.

Example VIII

This example demonstrates the anti-viral effectiveness of the lactoperoxidase/substrate/peroxide system and of the myeloperoxidase/substrate/peroxide system against genital herpes in the genital herpes guinea pig model (the intravaginal guinea pig model).

20 female Hartley guinea pigs received an intravaginal inoculation of  $10^5$  pfu of HSV2 MS virus. Beginning with day 4 and thereafter continuing daily until day 24, these guinea pigs were monitored for the appearance and development of herpes lesions (based on a scale from 0 to 4) and were treated by use of one of the three following gels:

1. A control gel (for a group of four guinea pigs) prepared having the formulation set forth for the gel only in example 9A of Table IX;

2. A gel containing a lactoperoxidase/substrate/peroxide system (for a group of eight guinea pigs) prepared having the formulation set forth in example 9A of Table IX, except that 88 IU of lactoperoxidase (per 100g of gel) was utilized and not 200 IU of lactoperoxidase;

-42-

3. A gel containing a myeloperoxidase/substrate/peroxide system (for a group of eight guinea pigs) prepared having the formulation set forth in example 3A of Table IX, except that 70.8 IU of myeloperoxidase (per 100g of gel) was utilized and not 200 IU of lactoperoxidase;

The development of herpes lesions occurs in two successive phases: the first phase (primary infection) is due to the inoculated virus; and the second phase (recurrences) is due to the reactivation, more or less frequent, of the virus present in the nerve cells in a latent form.

The treatment consisted of applying 0.6 grams of gel on the herpes lesions appearing around the external genital organs. The results of these experiments are summarized in Table XVI (wherein the effect of the treatments on the primary infection are summarized) and in Table XVII (wherein the effect of the treatments on the recurrences are summarized) and can be seen with reference to the graph set forth in figure 4.

Table XVI

Gel	Average Severity <sup>1</sup>	Average Maximal Score	Average Duration of Primary Infection
1	12.7	2.5	11
2	7.4 p 0.02 <sup>2</sup>	1.8 p 0.03 <sup>2</sup>	6.5 p 0.01 <sup>2</sup>
3	8.4 p 0.02 <sup>2</sup>	1.9 p 0.01 <sup>2</sup>	7.9 p 0.05 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Severity = The sum of the scores from day 4 to day 12

<sup>2</sup> Significant according to the Student's Test

-43-

Table XVII

Gel	Average Number of Recurrences*	Average Duration of a Recurrence (in days)
1	1.5	4.3
2	1.4 N.S. <sup>a</sup>	3 N.S. <sup>a</sup>
3	1.9 N.S. <sup>a</sup>	3.3 N.S. <sup>a</sup>

\* These is a recurrence if one measures, during two successive days, a score equal to 0.5 (erythema) or, during one day, at least one score equal to one (vesicule). A recurrence is preceded and followed by a day without lesions.

<sup>a</sup> Not significant according to the Students Test.

As can be seen from Table XVI and from figure 4, lesions from the primary infections were generally severe (maximal score 2.5-3) and persisted from day 4 to days 12-14, while lesions from the recurrences were relatively benign (maximal score 0.5-1) and disappeared after 3-4 days on average. The results of these treatments clearly show that the gels containing the lactoperoxidase or the myeloperoxidase significantly reduce the severity, the maximal scores and the duration of the primary infection.

#### Key To Figures 2 and 3

Figure 2 is illustrative of the growth of HIV-generated p24 in lymphocyte cultures by measurement of the p24 in the supernatant. Figure 3 is illustrative of the growth of HIV-generated p24 in lymphocyte cultures by measurement of intracellular p24 per  $10^6$  cells.

Symbols utilized in figures 2 and 3 are as follows:  
 Solid lines (—): preincubation 1 hour, in buffer alone (controls); Stippled lines (----): preincubation 1 hour, in

-44-

oxidizing complex. Final dilutions of HIV initial pool: 1:20 (•D); 1:100 (•B); and 1:200 (•A).

In view of the foregoing description and examples, it will become apparent to those of ordinary skill in the art that equivalent modifications thereof may be made without departing from the spirit and scope of this invention.

-45-

CLAIMS

1. The use of a peroxidase for the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of enveloped virus infections.
2. The use of claim 1, further characterized in that a oxygen donor and an oxidizable substrate for which the peroxidase is specific are also used for the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of enveloped virus infections.
3. The use of claim 1, further characterized in that the peroxidase is lactoperoxidase.
4. The use of claim 1, further characterized in that the enveloped virus is a herpes simplex virus.
5. The use of claim 1, further characterized in that the enveloped virus is a human immunodeficiency virus.
6. The use of claim 2, further characterized in that the oxygen donor is hydrogen peroxide.
7. The use of claim 2, further characterized in that the oxygen donor is an enzymatic system including a substrate and an enzyme specific for the substrate, such that hydrogen peroxide is formed thereby.
8. The use of claim 7, further characterized in that the substrate of the enzymatic system is glucose, and the enzyme of the enzymatic system is glucose oxidase.

-46-

9. The use of claim 2, further characterized in that the oxygen donor is an inorganic peroxide.

10. The use of claim 2, further characterized in that the oxygen donor is an organic peroxide.

11. The use of claim 2, further characterized in that the oxygen donor is a microorganism.

12. The use of claim 2, further characterized in that the oxidizable substrate is a thiocyanate salt.

13. The use of claim 2, further characterized in that the oxidizable substrate is a halide chosen from the group consisting of chloride, bromide and iodide.

14. The use of claim 1, further characterized in that the peroxidase is a mammalian peroxidase.

15. The use of claim 1, further characterized in that the peroxidase is myeloperoxidase.

16. The use of claim 1, further characterized in that the peroxidase is a plant peroxidase.

17. The use of claim 2, further characterized in that the substrate is a thiocyanate salt and the peroxidase is a mammalian peroxidase.

18. The use of claim 2, further characterized in that the substrate is a halide chosen from the group consisting of chloride, bromide and iodide and the peroxidase is a plant peroxidase or myeloperoxidase.

-47-

19. The use of claim 2, further characterized in that the oxidizable substrate is a thiocyanate salt, the oxygen donor is an enzymatic system including a glucose substrate and an glucose oxidase and the peroxidase is lactoperoxidase.

20. The use of claim 2, further characterized in that the oxidizable substrate is a thiocyanate salt, the oxygen donor is an enzymatic system including a glucose substrate and an glucose oxidase and the peroxidase is myeloperoxidase.

21. The use of claim 1, further characterized in that the medicament is a topical medicament.

22. The use of claim 1, further characterized in that the medicament is an oral dentifrice.

23. The use of claim 1, further characterized in that the medicament is an injectable composition.

24. A method for the preparation of a medicament for the prevention or treatment of enveloped viruses characterized in that the composition of claims 1 or 2 is combined with a pharmaceutically acceptable carrier.

25. A method for the prevention or treatment of enveloped viruses characterized in that a therapeutic or prophylactic effective amount of the medicament of claims 1 or 2 is administered to a patient in need thereof.

26. The method of claim 25, further characterized in that the enveloped virus is a herpes simplex virus.

27. The method of claim 25, further characterized in that the enveloped virus is a human immunodeficiency virus.

-48-

28. The method of claim 25, further characterized in that the medicament is topically administered.

29. The method of claim 25, further characterized in that the medicament is orally administered.

30. The method of claim 25, further characterized in that the medicament is injectably administered.

1/4

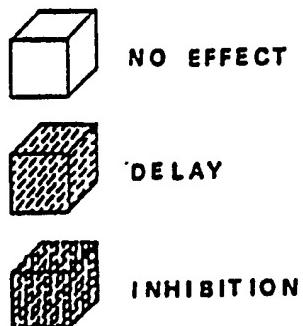
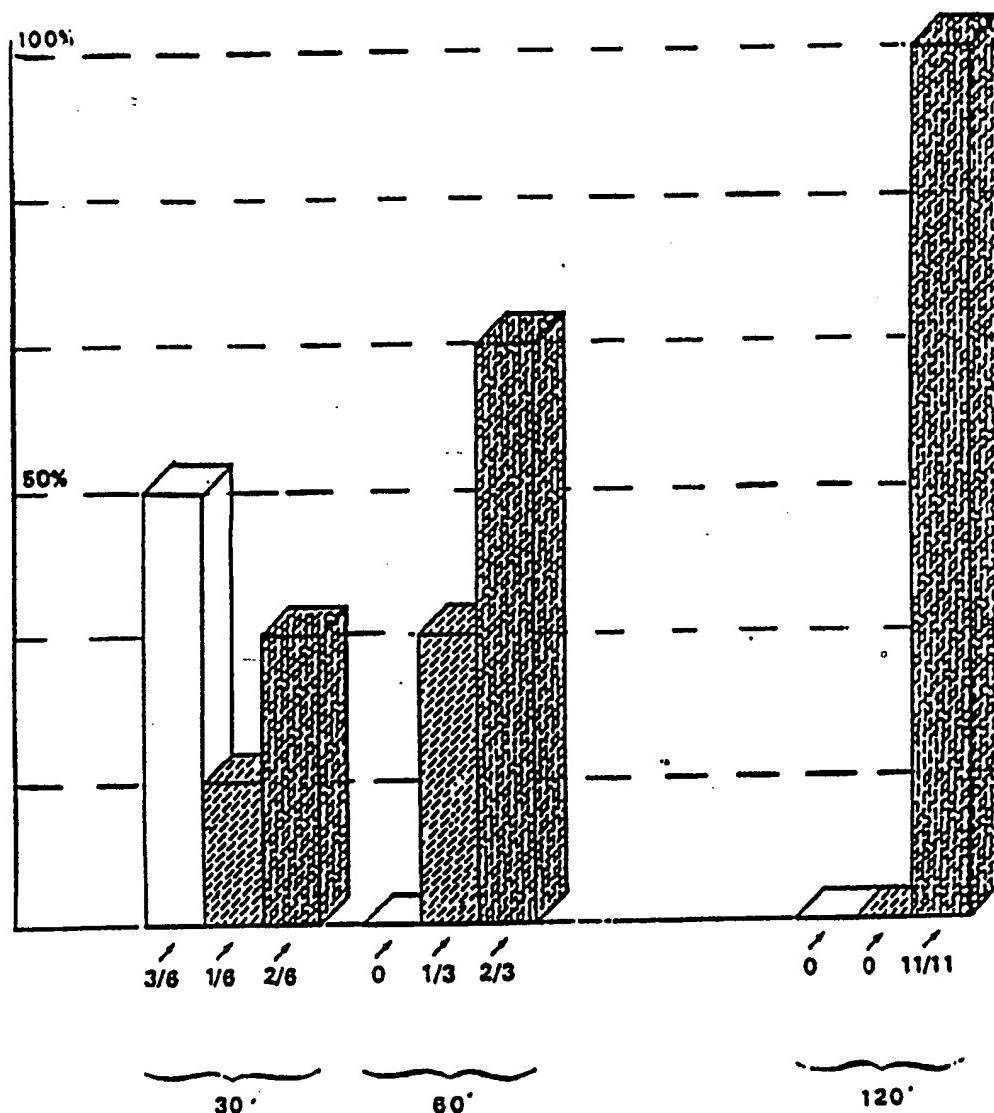


Figure 1

2/4

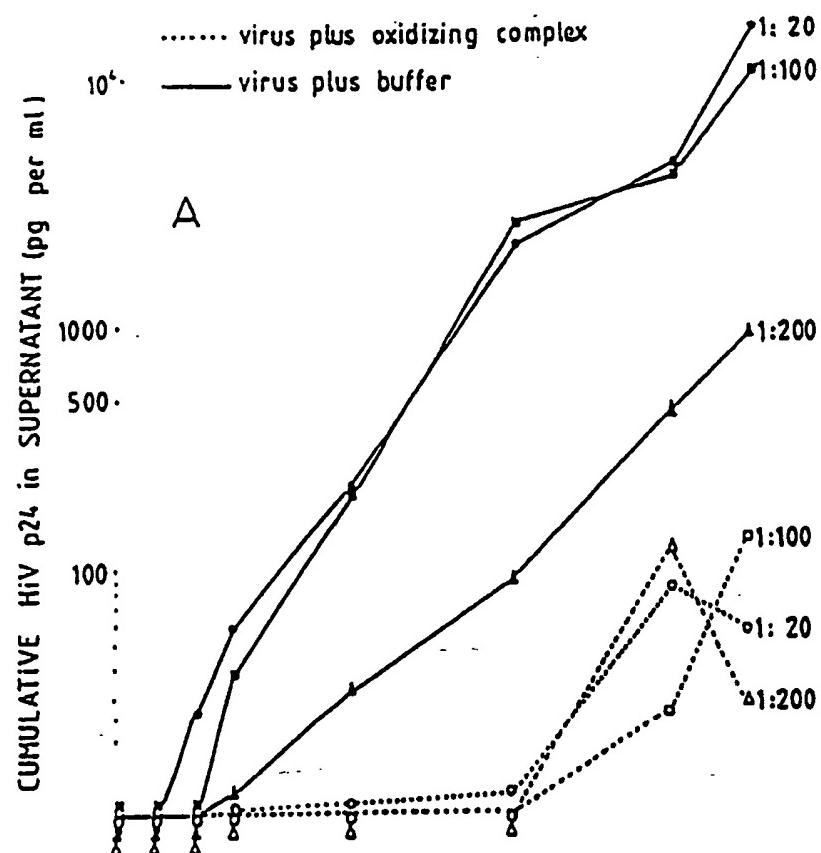


Figure 2

3/4

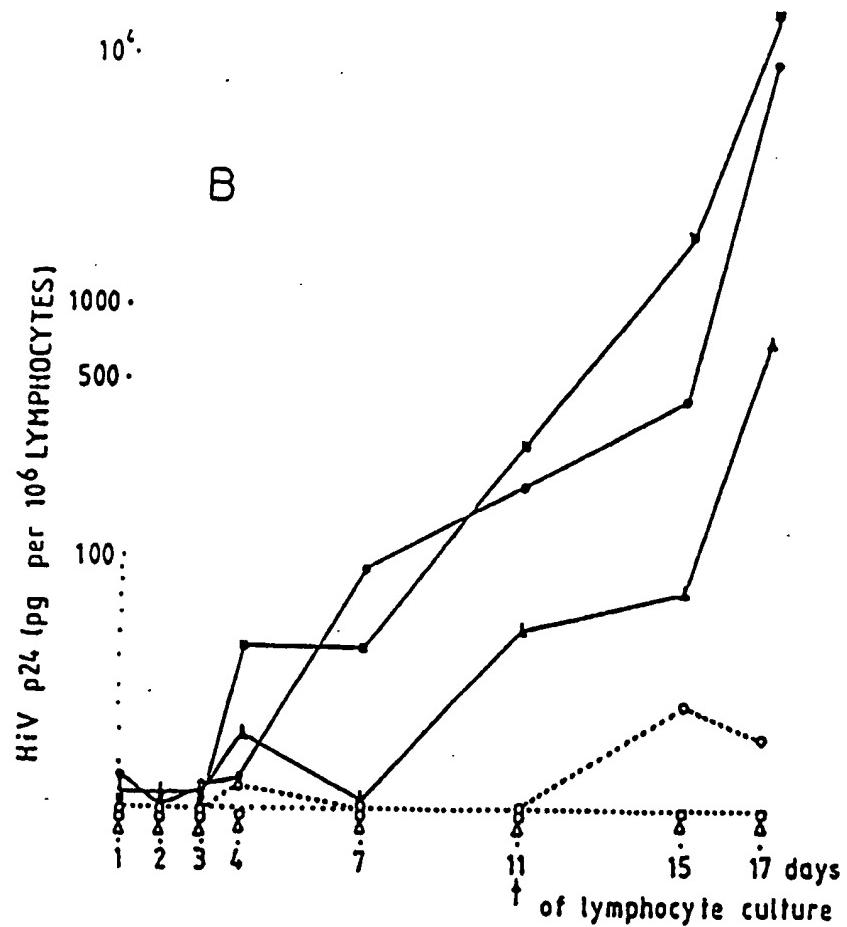
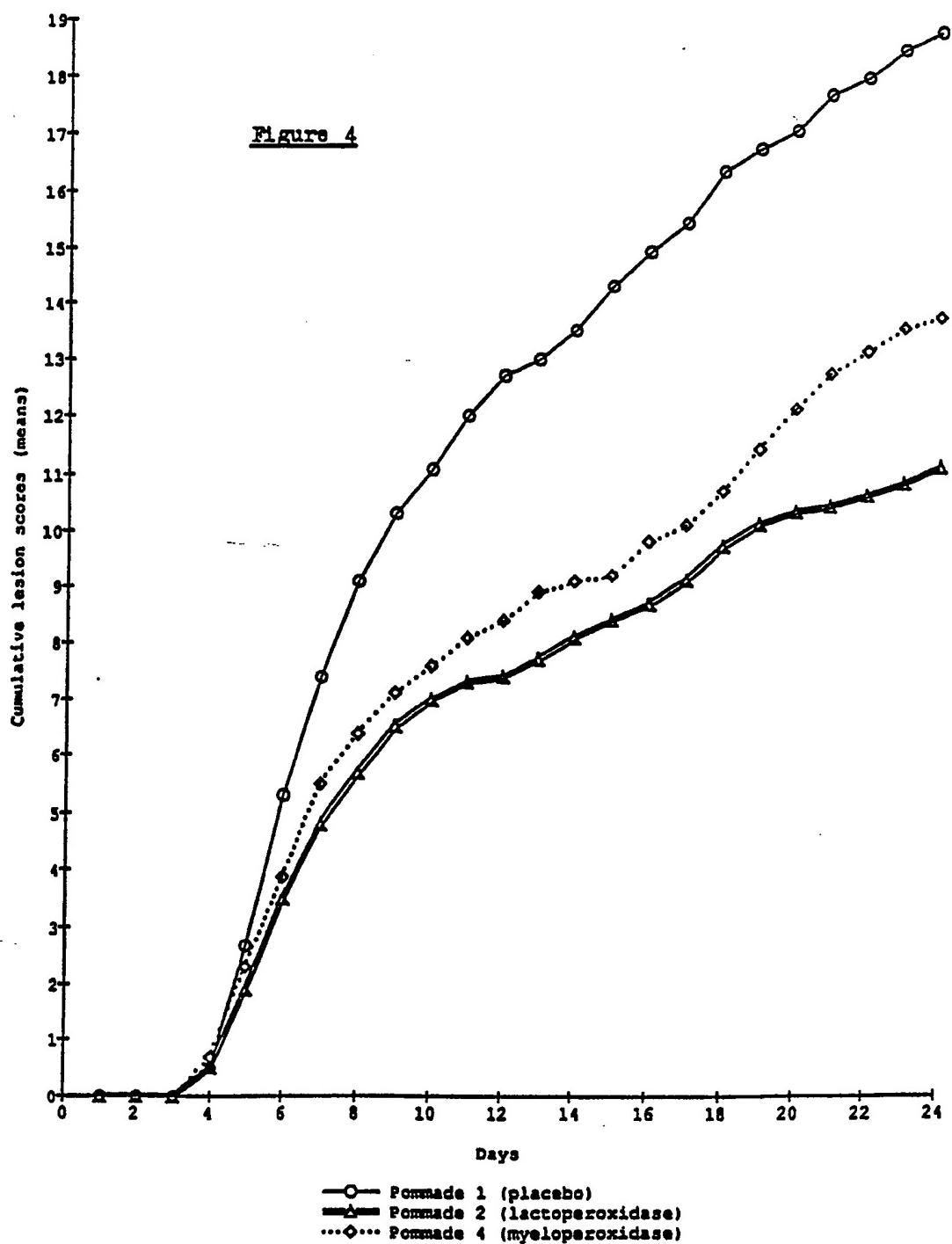


Figure 3

4/4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/BE 91/00048

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all)<sup>6</sup>

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.C1.5 A 61 K 37/50 A 61 K 7/28

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched<sup>7</sup>

Classification System	Classification Symbols
Int.C1.5	A 61 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched<sup>8</sup>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT<sup>9</sup>

Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	EP,A,0361908 (IDEON CORP.) 4 April 1990, see claims 1-5,10,11,14,15; page 4, lines 29-47; example 3 ---	1-24
A	WO,A,8912457 (UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES) 28 December 1989, see claims 14-23; page 28, lines 10-30; page 5, line 1 - page 7, line 21 (cited in the application) ---	1-24
A	Chemical Abstracts, vol. 72, no. 15, 13 April 1970 (Columbus, Ohio, US) M. Belding et al.: "Peroxidase-mediated virucidal systems", see page 129, abstract no. 76065g, & Sciences, 1970, 167(3915), 195-6 ---	1-24
A	EP,A,0127605 (IMMUNO AG) 28 January 1987, see claims 1,7; page 2, lines 23-32; example 4 ---	1-24 -/-

<sup>6</sup> Special categories of cited documents :<sup>10</sup><sup>"A"</sup> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<sup>"E"</sup> earlier document but published on or after the international filing date<sup>"L"</sup> document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<sup>"O"</sup> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<sup>"P"</sup> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<sup>"T"</sup> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<sup>"X"</sup> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step<sup>"Y"</sup> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<sup>"A"</sup> document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

04-10-1991

Date of Mailing of this International Search Report

05 NOV 1991

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

Signature of Authorized Officer

Mme N. KUIPER

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	EP, A, 0133736 (LACLEDE PROFESSIONAL PRODUCTS, INC.) 5 February 1986, see claims 1,2,9,17 (cited in the application) ----	1-24
P,X	Chemical Abstracts, vol. 115, no. 7, 2 September 1991 (Columbus, Ohio, US) S.J. Klebanoff et al.: "Virucidal effect of Lactobacillus acidophilus on human immunodeficiency virus type I: possible role in heterosexual transmission", see page 604, abstract 90532v, & J. Exp. Med. 1991, 174(1), 289-292 -----	1-24

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET**

V.  OBSERVATION WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claim numbers  
Authority, namely:  
25-30 because they relate to subject matter not required to be searched by this  
  
See PCT Rule 39.1(iv)  
Methods for treatment of the human or animal body  
by surgery or therapy, as well as diagnostic methods

2.  Claim numbers  
with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

3.  Claim numbers  
the second and third sentences of PCT Rule 8.4(a).  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with

**VI.  OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING** 2

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows:

- As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims of the International application
  - As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:
  - No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
  - As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

## **Remark on Protégé**

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

~~BEST AVAILABLE COPY~~

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

BE 9100048

SA 49101

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 24/10/91  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0361908	04-04-90	AU-A-	4402589	18-04-90
		WO-A-	9003185	05-04-90
WO-A- 8912457	28-12-89	FR-A-	2632525	15-12-89
		EP-A-	0372063	13-06-90
		JP-T-	3501327	28-03-91
EP-A- 0127605	05-12-84	AT-A-	382078	12-01-87
		CA-A-	1211709	23-09-86
EP-A- 0133736	06-03-85	US-A-	4537764	27-08-85
		US-A-	4564519	14-01-86
		JP-A-	59231011	25-12-84